615.2
Е-

С.К. ЕРЕМИН, Б.Н. ИЗОТОВ, Н.В. ВЕСЕЛОВСКАЯ

АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

ФИРМА ПРЕДОСТАВЛЯЕТ
СПЕЦИАЛЬНУЮ СКИДКУ ВУЗАМ

ХЬЮЛЕТТ-ПАККАРД
101000 МОСКВА
ПОКРОВСКИЙ Б-Р, 4/17, КВ. 12
ОТДЕЛ АНАЛИТИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ
ТЕЛ. 923 50 01

С.К. ЕРЕМИН, Б.Н. ИЗОТОВ, Н.В. ВЕСЕЛОВСКАЯ

АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

РУКОВОДСТВО ПО ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ

Под редакцией профессора Б.Н. Изотова

РОССИЙСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ БИБЛИОТЕКА

Москва «Мысль» 1993

Издание осуществлено по заказу ТОО "Селена"
в авторской редакции

Данное Руководство является первым в отечественной практике изданием, посвященным анализу наркотических и других одурманивающих веществ в объектах различного происхождения, главным образом в биообъектах.

В Руководстве рассмотрены ключевые вопросы химико-токсикологического анализа наркотических и других одурманивающих веществ, детально описаны этапы отбора и хранения проб, механизмы биотрансформации, методология выбора и использования предварительных и подтверждающих методов исследования, представлены методики качественного и количественного определения.

В основу Руководства положены авторские методики обнаружения и определения наркотических средств методами иммунохимии, тонкослойной, газовой, высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии и т. д.

Руководство предназначено для специалистов в области судебно-химического, клинико-токсикологического, криминалистического анализов, работников научно-исследовательских институтов, а также для преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических вузов.

© ТОО "Селена". 1993

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ — 3

ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ — 6

ГЛАВА 2. ТРЕБОВАНИЯ К ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 13

ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФАРМАКОКИНЕТИКА СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 17

ГЛАВА 4. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБЫ К АНАЛИЗУ — 51

ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ—54

ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 63

ГЛАВА 7. ЭКСПРЕССНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ — 65

ГЛАВА 8. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА — 76

ГЛАВА 9. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ — 99

ГЛАВА 10. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ТСХ-СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 105

ГЛАВА 11. ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ — 123

ГЛАВА 12. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ — 148

ГЛАВА 13. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ — 160

ГЛАВА 14. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ—171

ГЛАВА 15. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА — 183

ГЛАВА 16. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИООБЪЕКТАХ — 219

ГЛАВА 17. ГХ/МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРФИНА И КОДЕИНА В ВОЛОСАХ — 246

ПРИЛОЖЕНИЯ — 250

ПРЕДИСЛОВИЕ

Злоупотребление наркотиками и другими одурманивающими средствами весьма распространено, несмотря на меры, принимаемые мировым сообществом. Незаконное производство и оборот наркотиков, а также злоупотребление ими, сопровождаемые противоправными действиями, по-прежнему создают угрозу для здоровья и жизни людей, наносят серьезный ущерб экономике, подрывают нравственные основы общества. Угроза здоровью и жизни людей усугубляется распространением вируса ВИЧ вследствие антисанитарного внутривенного введения наркотиков; растет число детей с тяжелыми заболеваниями и серьезными умственными и физическими недостатками, рождаемыми матерями-наркоманками.

Ответственность за правонарушения, связанные с наркотиками, в Российской Федерации регламентируется Уголовным кодексом, Кодексом РФ об административных правонарушениях, Гражданским кодексом, а также Кодексом о браке и семье и Жилищным кодексом РФ.

Конвенция ООН о борьбе с незаконным оборотом наркотических средств и психотропных веществ, принятая 19 декабря 1988 г., и Резолюция Генеральной Ассамблеи ООН от 15 апреля 1990 г. по вопросу о международном сотрудничестве в борьбе с незаконным оборотом и распространением наркотических и психотропных средств рекомендуют странам-участницам взять под свой контроль: 1) производство, изготовление, склонение к употреблению, предложение с целью продажи, распространение, продажу, поставку на любых условиях, посредничество, переправку, транзитную переправку, транспортировку, импорт или экспорт любого наркотического средства или любого наркотического вещества; 2) культивирование опийного мака, кокаинового куста, конопли (индийской, южной маньчжурской или южной чуйской) либо других запрещенных к возделыванию наркотиксодержащих культур в целях производства наркотических средств в нарушение положений Конвенции ООН 1961 и 1971 гг.; 3) изготовление, транспортировку, распространение и продажу оборудования и полупродуктов для производства наркотических средств.

Аналитическая служба, осуществляющая химико-токсикологический анализ средств, вызывающих одурманивание, является одним из инструментов государства в борьбе с наркоманией, поскольку хорошо налаженная и оснащенная аналитическая служба позволяет контролировать все вышеперечисленные уголовно наказуемые деяния и способствует эффективной диагностике и лечению больных наркоманией.

В 1991 г. Верховным Советом РФ был принят законодательный акт, отменяющий уголовную ответственность за употребление наркотиков и как следствие запрещающий в общем случае принудительное обследование подозреваемых лиц с целью установления факта употребления наркотических и психотропных средств. Однако это не исключает возможности принудительного изъятия образцов крови, мочи и других биообъектов при необходимости проведения судебно-медицинской экспертизы в случаях, предусмотренных внутренним и международным законодательством.

Сложная финансово-экономическая и политическая обстановка в странах бывшего СССР и связанное с этим снижение авторитета и активности правоохранительных органов внушают большие опасения, что СНГ в самое ближайшее время может стать сферой активного внимания со стороны международного и отечественного наркобизнеса.

Внутри СНГ отмечается распространение полинаркомании, связанной с употреблением "лекарственных коктейлей" для усиления наркотического действия, с синтезом новых наркотических средств, вызывающих "мгновенное" привыкание, и т. д.

Предлагаемое Руководство охватывает основные сферы анализа (выбор объекта, пробоподготовка, выбор аналитического метода) вещественных доказательств, биожидкостей, тканей и органов на содержание средств, вызывающих одурманивание.

В Руководство включены аналитические материалы по анализу не только собственно наркотиков, но и других лекарственных средств, активно используемых наркоманами.

Учитывая все сложности анализа (возможность фальсификации пробы, ее сокрытия, малый объем, отрицание факта употребления, присутствие в биопробе большого количества фоновых эндогенных и экзогенных веществ и т. д.), в Руководстве изложена схема предварительных и подтверждающих методов анализа (тонкослойная хроматография, иммунохимические методы, газожидкостная и высокоэффективная хроматография, хромато-масс-спектрометрия).

Каждый практический раздел предваряется изложением теоретических основ каждого метода, что позволяет исследователю более осознанно его использовать.

В приложениях к Руководству собран материал, который необходим исследователю для практического осуществления анализа и интерпретации результатов.

Все предлагаемые методики утверждены бывшим Министерством здравоохранения СССР.

Большинство методических рекомендаций являются авторскими разработками сотрудников кафедры токсикологической химии Центральной химико-токсикологической лаборатории ММА им. И.М. Сеченова (Кислун Ю.В. "ГЖХ-скрининг наркотических и других одурманивающих средств в моче"; Ермаков А.Н., Смирнов А.В. "Поляризационный флюороиммуноанализ мочи на вещества, вызывающие одурманивание"; Еремин С.К., Бодрина Д.Э. (совместно с ВНИИ хроматографии). "ВЭЖХ-анализ опиатов, производных барбитуровой кислоты, фенилалкиламинов, производных 1,4-бензодиазепина").

В написании Руководства принимали участие также следующие сотрудники кафедры и ЦХТЛ:

Н.В. Веселовская, М.В. Белова, Е.В. Уфимцева ("Хромато-масс-спектральное определение наркотических и сильнодействующих веществ в биожидкостях");

Е.А. Симонов ("Определение морфина и кодеина в волосах");

М.В. Белова ("Каннабиноиды").

Остальные разделы Руководства написаны С.К. Ереминым и Б.Н. Изотовым.

Естественно, в первом издании могут быть допущены просчеты, и авторы с большой благодарностью примут все критические замечания и пожелания к предлагаемому Руководству, в необходимости издания которого у них нет сомнения.

Профессор Б.Н. Изотов

Авторский коллектив планирует к изданию "Аналитические профили наркотических и других одурманивающих средств" по отдельным группам психотропных средств: "Опиаты", "Фенилалкиламины", "Каннабиноиды" и др.

"Аналитические профили" представляют собой монографии, включающие фармакологические, фармако- и токсико-кинетические данные, а также аналитические характеристики конкретных групп веществ: физико-химические свойства, ИК-, УФ-, МС-спектры, различные методы пробоподготовки из различных объектов, современные методы анализа.

ГЛАВА 1

ВВЕДЕНИЕ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ

1.1. ПОНЯТИЕ О ВЕЩЕСТВАХ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

В последнее время за рубежом и у нас в стране широкое распространение получило стремление отдельных лиц испытать ощущение удовольствия при помощи химического воздействия — наркомания и токсикомания. Кроме табака и алкоголя современный человек принимает много других действующих на психику веществ, количество которых постоянно увеличивается благодаря изобретательности химиков-органиков.

Наркомания и токсикомания с медицинской точки зрения рассматриваются как болезнь, причиной которой является употребление средств, вызывающих зависимость (психическую, а иногда и физическую) между живым организмом и химическим веществом, характеризующуюся проявлениями, обязательно включающими необходимость приема одурманивающих веществ (постоянно или периодически) с целью испытать вызываемые ими психические ощущения, а иногда, наоборот, избежать неприятных ощущений, вызываемых их отсутствием. Человек может зависеть от нескольких одурманивающих средств.

Психическая зависимость — состояние, при котором наркотик (одурманивающее средство) вызывает чувство удовлетворения и которое требует периодического или постоянного приема наркотика с целью получения удовольствия или во избежание неприятных психических ощущений.

Физическая зависимость — адаптация, проявляющаяся в сильном физическом расстройстве при задержке приема наркотика. Это расстройство, а именно синдром абстиненции, или отнятия, складывается из определенного множества симптомов и признаков психического или физического свойства, характерных для каждого вида наркотиков (табл. 1 и 2).

Таблица 1. **Наркотические средства, являющиеся предметом злоупотребления (по классификации Всемирной организации здравоохранения)**

Вид наркотика	Психическая зависимость	Физическая зависимость	Толерантность
Алкоголь	Слабая до явно выраженной	Слабая до явно выраженной	Средняя
Барбитураты и некоторые другие успокаивающие средства	Слабая до явно выраженной	Слабая до явно выраженной	Значительная
Опиаты	Умеренная до явно выраженной	Явно выраженная	Явно выраженная
Кокаин	Слабая до явно выраженной	Отсутствует	Отсутствует
Амфетамин и некоторые другие стимуляторы	Слабая до явно выраженной	Незначительная или отсутствует	Явно выраженная
Кат (абиссинский чай)	Слабая до умеренной	Незначительная или отсутствует	Незначительная или отсутствует
Галлюциноген (ЛСД)	Слабая до умеренной	Отсутствует	Может быть явно выраженной с некоторыми агентами
Каннабис (марихуана, гашиш)	Слабая до умеренной	Незначительная или отсутствует	Возможна при больших дозах
Летучие растворители (для вдыхания)	Слабая до умеренной	Незначительная или отсутствует	Средняя с определенными агентами

Средства, вызывающие одурманивание, подразделяются на:

а) наркотические средства,

б) токсикоманические средства, в том числе средства, вызывающие лекарственную зависимость.

Термин "наркотическое средство" содержит в себе три критерия: медицинский, социальный и юридический. Они взаимосвязаны и в правовом аспекте обязывают признавать средство наркотическим только при единстве трех критериев, а именно: *медицинского,* если соответствующее средство оказывает специфическое действие на ЦНС, что и является причиной его немедицинского применения; *социального*, если его немедицинское применение принимает масштабы, приобретающие социальную значимость, и *юридического,* если, исходя из двух вышеназванных критериев, МЗ страны признало это средство наркотическим и включило его в список наркотических средств.

В случае отсутствия хотя бы одного из критериев одурманивающее средство относится к средствам, вызывающим токсикоманию или лекарственную зависимость.

Отнесение тех или иных психотропных средств к группам веществ, находящихся под контролем, является прерогативой министерства здравоохранения каждой страны и определяется соответствующими перечнями веществ.

Таблица 2. **Фармакологическое воздействие наркотических средств**

Наркотики	Улучшение настроения	Нейропсихологическая токсичность	Толерантность	Синдром отнятия	Психические заболевания	Физические заболевания	Возможность летальных исходов
ОПИАТЫ							
Опиум	+	+	+	+	+	+	+
Морфий	+	+	+	+	+	+	+
Героин	+	+	+	+	+	+	+
Синтетические протагонисты	+	+	+	+	+	+	+
ОСНОВНЫЕ ПСИХОСТИМУЛЯТОРЫ							
Кокаин	+	+	+	+	+	+	+
Амфетамины	+	+	+	+	+	+	+
ПСИХОДЕПРЕССАНТЫ							
Этиловый спирт (50 мг в день)	+	+	+	+	+	+	+
Барбитураты	+	+	+	+	+	+	+
Бензодиазепины	+	+	+	+	+	+	+
Метаквалон	+	+	+	+	+	+	+
КАННАБИС							
Гашиш, марихуана	+	+	+	+	+	+	+
ГАЛЛЮЦИНОГЕНЫ							
ЛСД	+	+	+	+	+		+
Псилоцибин	+	+	+				+
Мескалин	+	+	+				+
Фенциклидин	+	+		+	+	+	+
РАСТВОРИТЕЛИ							
Бензин	+	+	+			+	+
Ацетон	+	+	+			+	+
Трихлорэтилен	+	+	+			+	+
Эфир, хлороформ	+	+	+			+	+
ВТОРОСТЕПЕННЫЕ ПСИХОСТИМУЛЯТОРЫ							
Табак (никотин)	+		+	+		+	
Кола	+	+					
Кат (абиссинский чай)	+	+	+				
Кофеин	+	+					

По рекомендации Комитета по контролю за использованием наркотиков при ООН постоянный контроль должен осуществляться за употреблением следующих психотропных средств: опиатов, каннабиноидов, метаквалона, амфетамина и его производных, кокаина, производных 1,4-бензодиазепина и барбитуровой кислоты, фенциклидина и других галлюциногенов.

1.2. ОСОБЕННОСТИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НА СОДЕРЖАНИЕ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ

Анализ наркотических и других одурманивающих средств имеет некоторые специфические особенности и отличается от собственно судебно-химического и клинического анализов острых отравлений.

Его целью является установление факта присутствия наркотических и других одурманивающих средств независимо от тяжести состояния, т.е. от найденных количеств вещества. Главная задача анализа — идентификация средств, вызывающих одурманивание. В анализе наркотических и других одурманивающих средств существуют два основных направления: судебно-правовое (установление факта присутствия, употребления) и клиническое (лечение, реабилитация, диагностика). Методы, которые используются в химико-токсикологическом анализе наркотических средств, самые разнообразные. При судебно-правовой направленности вещество анализируется как минимум двумя методами, причем один из этих методов используется для предварительного исследования, а другой — для подтверждающего исследования.

В силу специфики анализа на содержание наркотических и других одурманивающих средств (сокрытие факта употребления, фальсификация проб и т.д.) в основу его методологии положен метод скрининга, используемый при "ненаправленном" анализе, т.е. при анализе на неизвестное вещество.

Первый этап скрининга ставит своей целью получение наименьшего количества ложноотрицательных результатов. Например, отрицательный результат вообще при анализе биологических жидкостей означает следующее:

а) обследуемый никогда не употреблял наркотик;

б) обследуемый употребляет наркотик нерегулярно, но в последнее время его не употреблял;

в) зная, что будет подвергнут анализу, обследуемый прекратил его употребление для того, чтобы был получен отрицательный ответ;

г) обследуемый разбавил образец во время отбора пробы или выпил большое количество жидкости либо мочегонное средство перед тем, как у него должны брать пробу;

д) обследуемый подменил пробу принесенной с собой биожидкостью.

Отсюда следует, что получение ложноотрицательных результатов связано с:

а) недостаточной чувствительностью используемого метода;

б) преднамеренной фальсификацией пробы и т.д. (см. выше);

в) недостаточной квалификацией эксперта;

г) систематическими ошибками исследований.

Второй этап скрининга состоит в удалении ложноположительных результатов.

Положительный результат вообще означает, что обследуемый принимает наркотик: а) постоянно; б) нерегулярно; в) по рецепту врача или самостоятельно или что предварительные методы обнаружения недостаточно надежны.

Ложноположительные результаты (а их может быть 10 — 15%) обусловлены недостаточной специфичностью метода за счет перекрестных реакций, слабой профессиональной подготовкой эксперта, систематическими ошибками, грязными реагентами, плохой организацией труда, некачественной документацией. Так, например, идентификация методом ТСХ затрудняется присутствием в биопробе продуктов курения табака (никотин и его метаболиты), потреблением кофе, чая, какао, других лекарственных средств.

Система анализа средств, вызывающих одурманивание, включает в себя, как и другие виды анализа, следующие основные этапы: пробоотбор, пробоподготовку, выбор методов анализа и собственно анализ, обработку и выдачу результатов (интерпретацию полученных результатов).

Надежность результатов анализа, полученных с помощью скрининга, определяется:

1) правильностью организационных мероприятий (отбор пробы, хранение проб, постоянный контроль за работой оборудования, чистотой реагентов и др.);

2) чувствительностью и специфичностью используемых методов;

3) знанием природы вещества, способов введения в организм, распределения в организме, степени метаболизма, путей выведения, а также индивидуальными особенностями организма.

Выбор аналитических методов для скрининга одурманивающих средств определяется целью анализа — добиться минимума отрицательных и максимума положительных результатов — и связан с такими главными параметрами анализа, как чувствительность и специфичность, так как этими параметрами определяется наличие ложноотрицательных и ложноположительных результатов соответственно.

Чувствительность аналитического метода определяется как отношение сигнала анализируемого вещества к сигналу базовой линии и выражается в нанограммах на миллилитр (нг/мл) или в граммах на килограмм (г/кг) биообъекта. Выбор метода с плохой чувствительностью грозит необнаружением искомого вещества (ложноотрицательный результат), и с этих позиций чувствительность предварительных методов очень важна, так как при отрицательном результате дальнейшего обнаружения не проводится (результат имеет отрицательное судебно-химическое значение). Если метод обладает очень высокой чувствительностью, то наркотическое вещество может быть детектировано даже спустя несколько дней или недель после употребления.

Под *специфичностью* понимают способность метода отличать химическую структуру данного соединения от ему подобных (аналогов).

В настоящее время при анализе на содержание наркотических и других одурманивающих средств используются аналитические методы, выбор которых определяется, с одной стороны, видом анализируемого образца, а с другой — обстоятельствами дела.

Все разнообразные объекты, подвергаемые анализу, можно разделить на следующие группы:

1) образцы растительного происхождения (конопля, опиум), их экстракты и производные;

2) твердые субстанции (порошки);

3) таблетки, драже;

4) инъекционные растворы;

5) биологические образцы (моча, кровь, волосы, ногти и органы).

В качестве основных предварительных скрининговых методов для обнаружения средств, вызывающих одурманивание, используются химические (хромогенные, микрокристаллические реакции), иммунохимические методы (ИФА, РИА, ПФИА и др.) и тонкослойная хроматография. В табл. 3 приведены данные по чувствительности некоторых методов, используемых для обнаружения наркотических средств в моче.

Таблица 3. Чувствительность некоторых методов (нг/мл)

Вещество	ИФА	ТСХ	ГЖХ	ГХ/МС
Амфетамины	300	500 — 1000	500	10 — 100
Барбитураты	300	500	500	10 — 50
Бензодиазепины	300	100	500	10 — 50
Метаболиты кокаина	300	1000	1000	10 — 100
Метадон	300	1000	200	10 — 100

В качестве подтверждающих методов исследования используются ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ/МС. Подтверждающие методы должны быть выше или равными по чувствительности, чтобы уменьшить количество ложноотрицательных результатов, но обязательно должны быть выше по специфичности, для того чтобы снизить количество ложноположительных результатов.

Таким образом, при выборе аналитического метода необходимо учитывать его преимущества и недостатки (табл. 4). В любом случае, даже при использовании самого чувствительного метода, результаты скрининга должны быть подтверждены аналитическими методами, основанными на других физико-химических принципах.

Таблица 4. **Сравнение преимуществ и недостатков некоторых аналитических методов**

Преимущества	Недостатки
I. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	
1. Объективность результатов 2. Хорошая чувствительность 3. Полуколичественная оценка 4. Простота выполнения 5. Умеренная стоимость реагентов 6. Быстрота анализа	1. Перекрестно реагирующие вещества могут дать ложноположительный результат 2. Групповой метод не различает индивидуальных соединений внутри группы, что приводит к частичному сокрытию полного набора веществ
II. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	
1. Низкая стоимость реагентов 2. Хорошая чувствительность 3. Высокая специфичность 4. Количественное определение	1. Требуется высококвалифицированный персонал 2. Низкая обеспеченность приборами 3. Длительность (относительная) анализа 4. Иногда зависит от субъективной интерпретации результатов

1.3. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (ХТА) СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

Особенностью анализа, имеющего судебно-правовую направленность, является то, что юридические вопросы решаются естественнонаучными методами, а полученный результат на конечной стадии преобразуется в юридический ответ. Отсюда ХТА наркотических и других одурманивающих средств должен быть системным, т.е. сопровождаться контролем каждой стадии анализа.

Рис. 1. Общая схема аналитического процесса

Контроль каждой стадии аналитического процесса должен осуществляться следующими типичными методами:

1) применение эталонных образцов;
2) калибровка проведенных операций (проверка правильности);
3) статистическая обработка (проверка воспроизводимости);
4) контроль за условиями процесса (температура, pH и т.д.).

ГЛАВА 2

ТРЕБОВАНИЯ К ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

Надежность работы лаборатории, занимающейся анализом наркотических и других одурманивающих средств, определяется целым рядом требований:

1. Лаборатория должна пройти внешнее профессиональное тестирование (внешний контроль) и быть аттестована.
2. Каждый химик-эксперт должен доказать свой профессиональный уровень (пройти внутренний контроль).
3. Каждый прибор должен иметь инструкцию по эксплуатации.
4. Все используемые реагенты должны иметь отметку о дате изготовления и паспортизованы.
5. Каждый этап методики должен быть подробно описан и иметь метрологическую оценку (линейность, воспроизводимость, предел обнаружения и др.).
6. Используемые эталонные вещества сравнения (стандарты) должны быть паспортизованы.
7. Должны быть известны пределы обнаружения анализируемых веществ по каждому используемому аналитическому методу.
8. В хроматографических методах желательно использовать внутренние стандарты.
9. Правила отбора и хранения образцов должны быть регламентированы. Должна быть известна степень стабильности анализируемых веществ в условиях хранения.
10. Каждый положительный результат должен быть подтвержден другим аналитическим методом. Исключение может быть сделано только в случае направленного анализа, т.е. ожидаемого результата.

В химико-токсикологическом анализе для получения идентичных аналитических данных исследователю необходимо иметь рациональную программу использования стандартов, вспомогательных материалов, их качественную и количественную статистику.

Стандартное вещество. Чистые вещества в стабильной сухой порошкообразной форме, свободные от каких-либо наполнителей или других фармацевтических материалов, являются основой, из которой готовятся все эталонные и контрольные смеси. Они должны находиться в стабильной форме соли, кислоты или основания, известной молекулярной формулы и веса. Образцы или метаболиты, полученные из различных источников, должны иметь 100%-ную чистоту.

Вещества, используемые как стандарты, должны быть проанализированы преимущественно масс-спектроскопией, газохроматографически и (или) жидкостной хроматографией для того, чтобы определить примеси в них, перед тем как использовать их в лаборатории. В общем случае точную концентрацию вещества в растворе можно рассчитать, если известны его молекулярная формула и величина навески. Внимание должно быть обращено на коррекцию молярной массы для кислых или основных солей, а также для гидратированной воды, когда готовятся эквивалентные (нормальные) концентрации свободных кислот и оснований. Рекомендуется, чтобы стабильные чистые вещества хранились в сейфе, а нестойкие лекарства, идентифицированные по коду,— в холодильнике или в морозильной камере.

Эталонные растворы представляют собой растворы стандартного вещества (лекарства) точной концентрации в дистиллированной или деионизированной воде либо в органическом растворителе. Они применяются для аналитического контроля и (или) калибровки аналитических приборов. Эти растворы готовятся взвешиванием точного количества чистого вещества и растворением его в определенном точном объеме органического растворителя (обычно этаноле или метаноле). Если вещество растворимо в виде соли, может быть использована вода. Эталонные растворы должны готовиться в мерных склянках I класса точности, конечные растворы должны быть помечены, датированы, и должна быть указана фамилия приготовившего раствор. Очень важно, чтобы аналитические весы были точными и чувствительными и использовались в своих рабочих пределах.

Концентрация каждого эталонного раствора периодически должна проверяться для определения его стабильности во время хранения. Хранение в холодильнике или в морозильной камере, в стеклянных виалах с плотно завинчивающимися тефлоновыми крышками обеспечивает устойчивость эталонов в течение длительного времени. Обычно приготавливается два или три идентичных эталонных раствора для того, чтобы можно было их проверить относительно друг друга на стабильность и точность концентрации. Для "старых" стандартов всегда делаются параллельные испытания.

Рекомендуется использовать эталонные растворы следующих концентраций (мг/мл):

Амфетамин и его производные	1,0
Производные барбитуровой кислоты	1,0
Производные 1,4-бензодиазепина	0,5
Бензоилоэкгонин	1,0
Каннабиноиды	0,2
Кодеин	1,0
Метадон	1,0
Морфин	0,5

Рабочие растворы готовятся путем разбавления эталонных растворов водой или органическим растворителем. Определенный объем рабочих растворов добавляется к известному объему воды или биообразца для построения градуировочной кривой (градуировочные (калибровочные) растворы).

Кровь, моча и ткани, используемые в качестве основы для построения модельных опытов, должны быть предварительно проанализированы на отсутствие в них определяемых соединений.

Водные рабочие растворы всегда используются, когда надо избежать влияния этанола или метанола на экстракционные характеристики некоторых лекарств. Кроме того, они применяются для проверки удерживаемых объемов в жидкостной хроматографии.

Вновь приготовленные рабочие растворы должны быть сравнены с таким же раствором, приготовленным ранее. Для этого старый и новый рабочие стандарты должны быть добавлены в биологический образец и проанализированы.

Контрольный образец (модельный опыт)— биологический образец, содержащий анализируемое вещество известной концентрации в биоматрице, идентичной исследуемым объектам. Этот образец анализируется в одной серии с неизвестным образцом, для того чтобы проконтролировать качество анализа. Для объективности концентрация вещества в контрольном образце должна быть неизвестна аналитику, т.е. она должна быть приготовлена другим сотрудником.

Холостой образец — биологический образец, идентичный по составу биоматрице контрольного, не содержащий подозреваемого вещества. *Холостой опыт* производится для того, чтобы определить систематическую ошибку, называемую фоном. *Фон* — это аналитический сигнал, являющийся результатом совместного действия компонентов в биоматрице, вводимых реагентов и операций, производимых с образцом, вплоть до момента измерения. Компоненты биоматрицы (*фон биоматрицы)* могут искажать результаты анализа, давая положительную или отрицательную ошибку.

При каждом количественном определении сначала должен быть сделан холостой, а затем контрольный опыт. Для контрольного опыта аликвота водного рабочего раствора добавляется к холостому образцу той же биожидкости, что и в аналитическом образце, таким образом, чтобы величина концентрации вещества находилась в линейных пределах градуировочной кривой.

Внутренний стандарт — соединение, химически схожее с анализируемым. Он добавляется к биообразцу в известных количествах перед анализом. Внутренний стандарт может быть использован как метка в качественном анализе.

Существует несколько источников ошибок, возможных при проведении анализа объектов как биологического, так и небиологического происхождения. Знание их позволяет значительно повысить надежность анализа. Основные из них следующие:

1. Техника эксперимента.
2. Подготовка образца, особенно его многоэтапность.
3. Методы хранения биообъекта и образца.
4. Ошибка вычисления.
5. Субъективные факторы аналитика.

При выборе как предварительных, так и подтверждающих методов исследования руководствуются следующими соображениями:

а) доступностью метода, оборудования, реагентов;

б) наличием необходимой инфраструктуры для размещения и обслуживания;

в) трудоемкостью;

г) экспрессностью;

д) простотой выполнения анализа;

е) заменяемостью;

ж) стоимостью анализа;

з) юридическим признанием метода;

и) техникой безопасности.

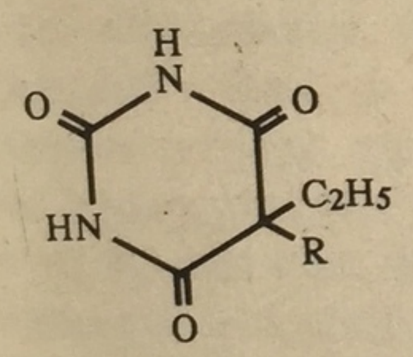
ГЛАВА 3

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФАРМАКОКИНЕТИКА СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

3.1. ПРОИЗВОДНЫЕ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

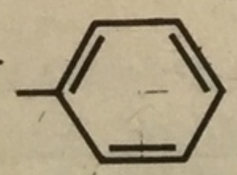
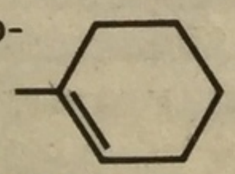
3.1.1. Физико-химические свойства

Производные барбитуровой кислоты являются депрессантами центральной нервной системы и часто используются как седативно-снотворные средства. Длительность действия барбитуратов очень различна: от 15 минут (ультракороткие) до одного и более дней (пролонгированного действия). Из 2500 производных барбитуровой кислоты наиболее часто в Российской Федерации отмечается злоупотребление фенобарбиталом, барбиталом, циклобарбиталом, этаминалом натрия, барбамилом и некоторыми другими. К собственно наркотическим средствам отнесены два последних: барбамил и этаминал натрия. По своим физико-химическим свойствам производные барбитуровой кислоты относятся к веществам кислотного характера. Основные фармакокинетические параметры некоторых барбитуратов приведены в табл. 5.



Общая формула барбитуратов

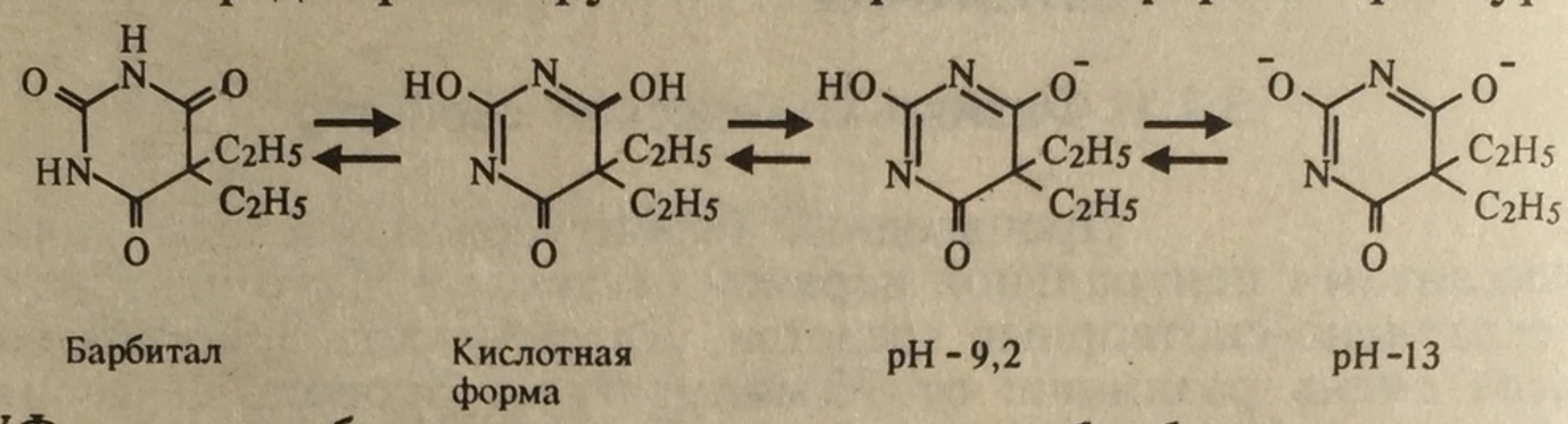
Таблица 5. **Фармакокинетические параметры барбитуратов**

Соединение	R	pK_a	Концентрация в плазме, мг/л		Продолжительность действия, час	$T_{1/2}$, дней	Выделение в неизмененном виде, %
			токсическая	летальная			
Барбитал	$-C_2H_5$	7,8	20	40	12 — 24	4	70 — 40
Фенобарбитал		7,3	40	60	10 — 18	3	30
Циклобарбитал		7,6	10		8 — 17	2 — 6	
Барбамил	$-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$	7,9	9	15	8 — 40	1	17

Этаминал натрия	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_3$	8,0	10	15	4 — 8	15 —48	10

Примечание. pK_a — константа ионизации; $T_{1/2}$ — период полувыведения.

Эти вещества плохо растворяются в воде, хорошо растворимы в этаноле, хлороформе, эфире, в водных растворах щелочей. Растворимость в щелочах объясняется тем, что в результате таутомерии в щелочной среде превалирует ионизированная форма барбитуратов.



УФ-спектры большинства производных барбитуровой кислоты схожи, они не имеют заметного поглощения в области 200 — 330 нм при кислых и нейтральных значениях pH, но имеют два максимума поглощения при щелочных значениях pH, которые характеризуют поглощение ионизированных форм первой (238 — 240 нм) и второй (254 — 256 нм) ступени диссоциации (табл. 6). Типичный УФ-спектр барбитуратов представлен на рис. 2.

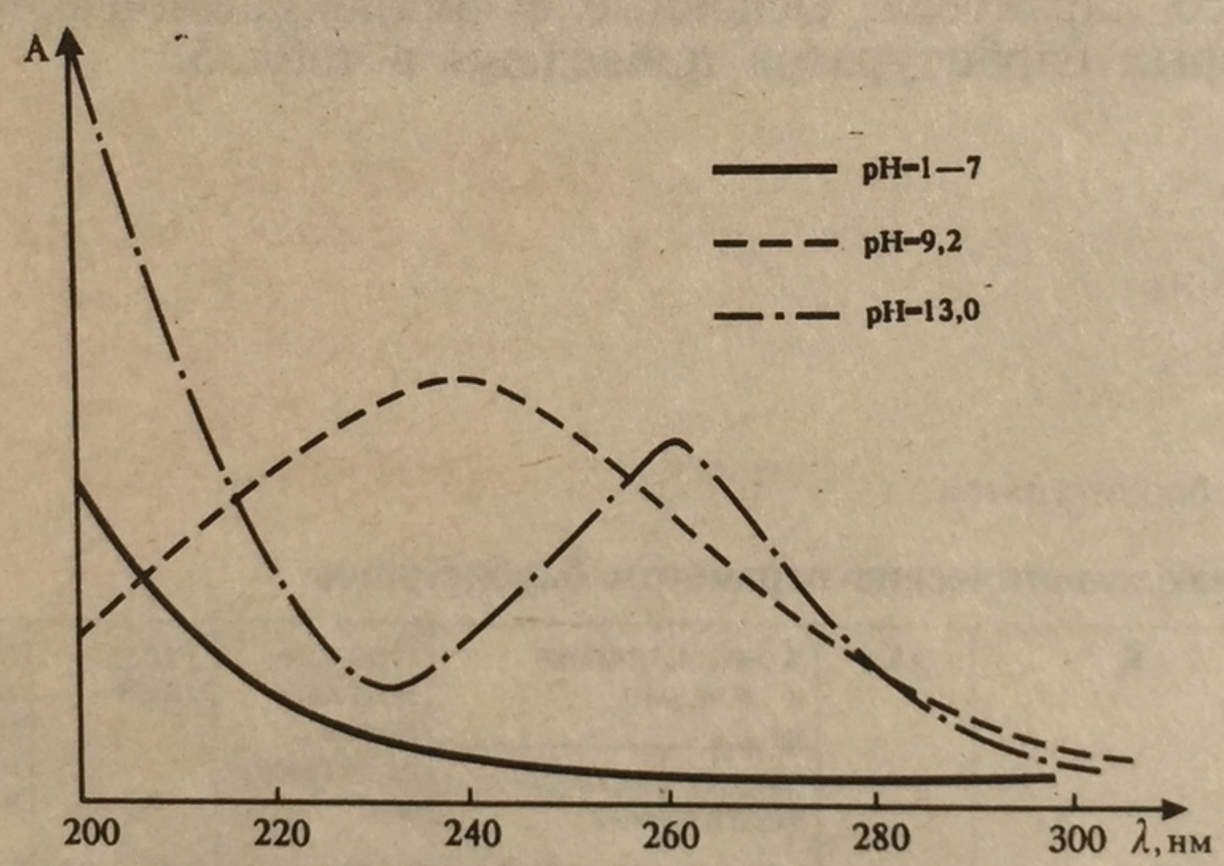


Рис. 2. УФ-спектр барбитуратов

Таблица 6. **УФ-спектральные характеристики барбитуратов**

Анализируемое вещество	pH = 9,2		pH = 13,0	
	ε_a	$\lambda_{нм}$	ε_a	$\lambda_{нм}$
Барбитал	549	239	427	254
Фенобарбитал	452	239	342	254
Циклобарбитал	410	240	301	243

Барбамил	445	240	364	255
Этаминал натрия	438	239	327	255

Основные характеристические частоты ИК-спектров сведены в табл. 7.

Таблица 7. **Основные характеристические частоты ИК-спектров барбитуратов ($см^{-1}$)**

Барбитал	Фенобарбитал	Циклобарбитал	Барбамил и этаминал натрия	Тип колебаний и связь	
1680	1684	1693	1685	— NH —	(деформационные)
1720	1712	1725	1719	C = O	(валентные)
1767	1770	1745	1744	— CONH —	(валентные)
1320	1310	1300	1315	>C — N<	(валентные)
1245		1210	1218	C = O	(деформационные)
875		830	845	>C — H	(деформационные)

3.1.2. Фармакокинетика и метаболизм барбитуратов

Все барбитураты быстро всасываются после орального введения (биодоступность 90 — 100%). Из организма они выводятся (экскретируются) с мочой в самых разнообразных формах, как в неизмененном виде, так и в виде метаболитов. Барбитураты пролонгированного действия (типа фенобарбитала) экскретируются в значительных количествах в неизмененном виде, в то время как барбитураты среднего действия (барбамил, этаминал натрия) интенсивно метаболизируют и в виде исходного соединения выделяются в очень небольших количествах.

Барбитал почти целиком (70 — 90%) в неизмененном виде экскретируется с мочой. Элиминирование медленное (период полувыведения — 4 дня). Около 2% дозы экскретируется за 8 часов, около 16% — в течение 32 часов. Детектируемые количества обнаруживаются в течение 16 дней.

Фенобарбитал метаболизирует в основном до глюкуронидов — β, D-глюкозопиранозилфенобарбитала и 4-гидроксифенобарбитала (схема 1).

Среди других метаболитов имеются два дигидродиола и гидроксиметилфенилбарбитуровая кислота. При хроническом употреблении около 25% дозы экскретируется с мочой в течение 24 часов в неизмененном виде, 17% — в виде 4-гидроксипроизводного, около половины которого — глюкуронид. Экскреция с мочой неизмененного вещества увеличивается в щелочной моче или с увеличением

МЕТАБОЛИЗМ ФЕНОБАРБИТАЛА

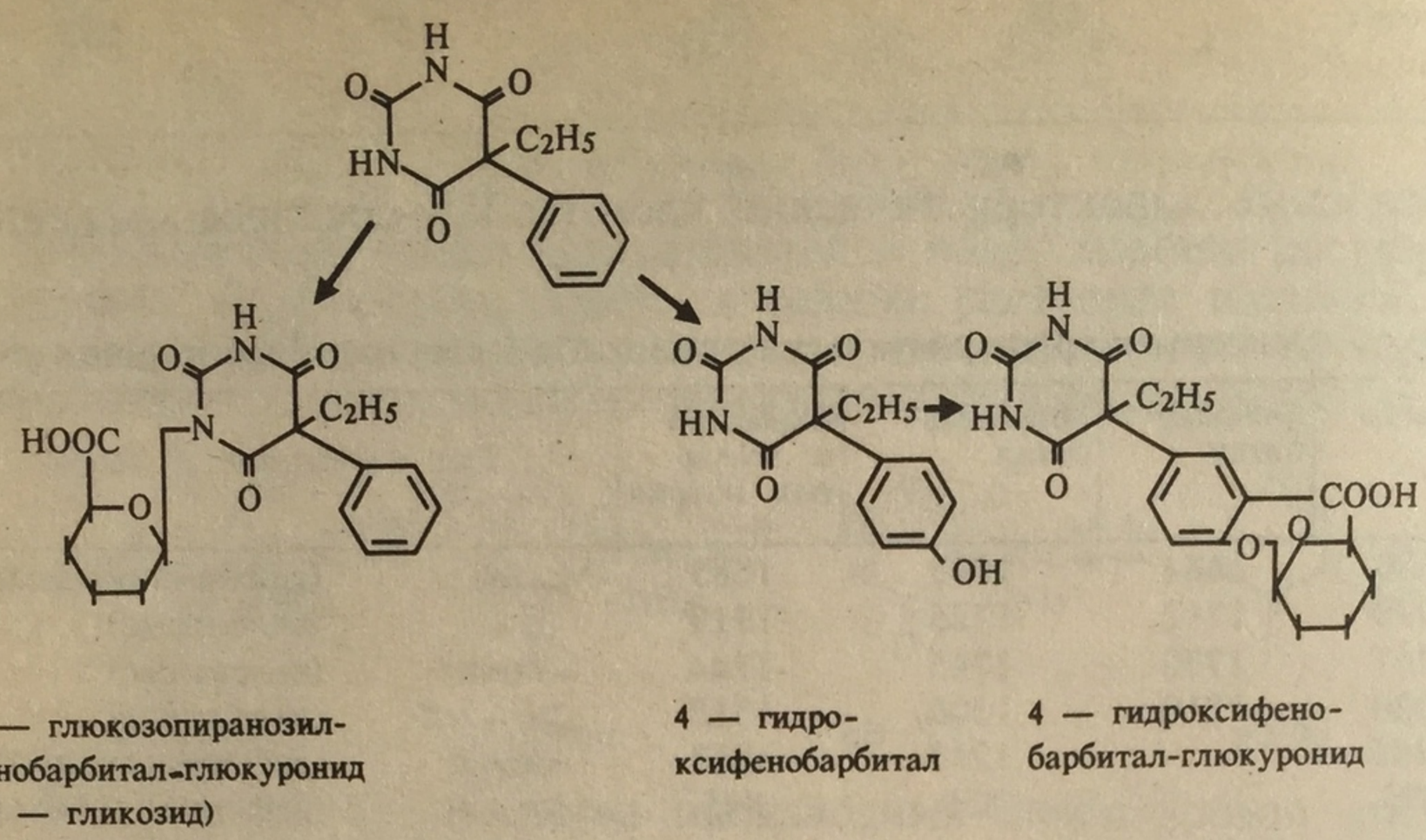


Схема 1

объема мочи. После однократной дозы от 80 до 90% экскретируется с мочой в течение 16 дней (30% — N-гликозид).

Этаминал натрия экскретируется с мочой в течение 5 дней (80% дозы) в виде: 3-гидроксипроизводного (37%), свыше 13% — N-гидрокси-; от 7 до 14% — 3-оксо-; от 10 до 15% 3-карбоксипроизводных; около 1% выделяется в неизмененном виде (схема 2).

МЕТАБОЛИЗМ ЭТАМИНАЛА НАТРИЯ

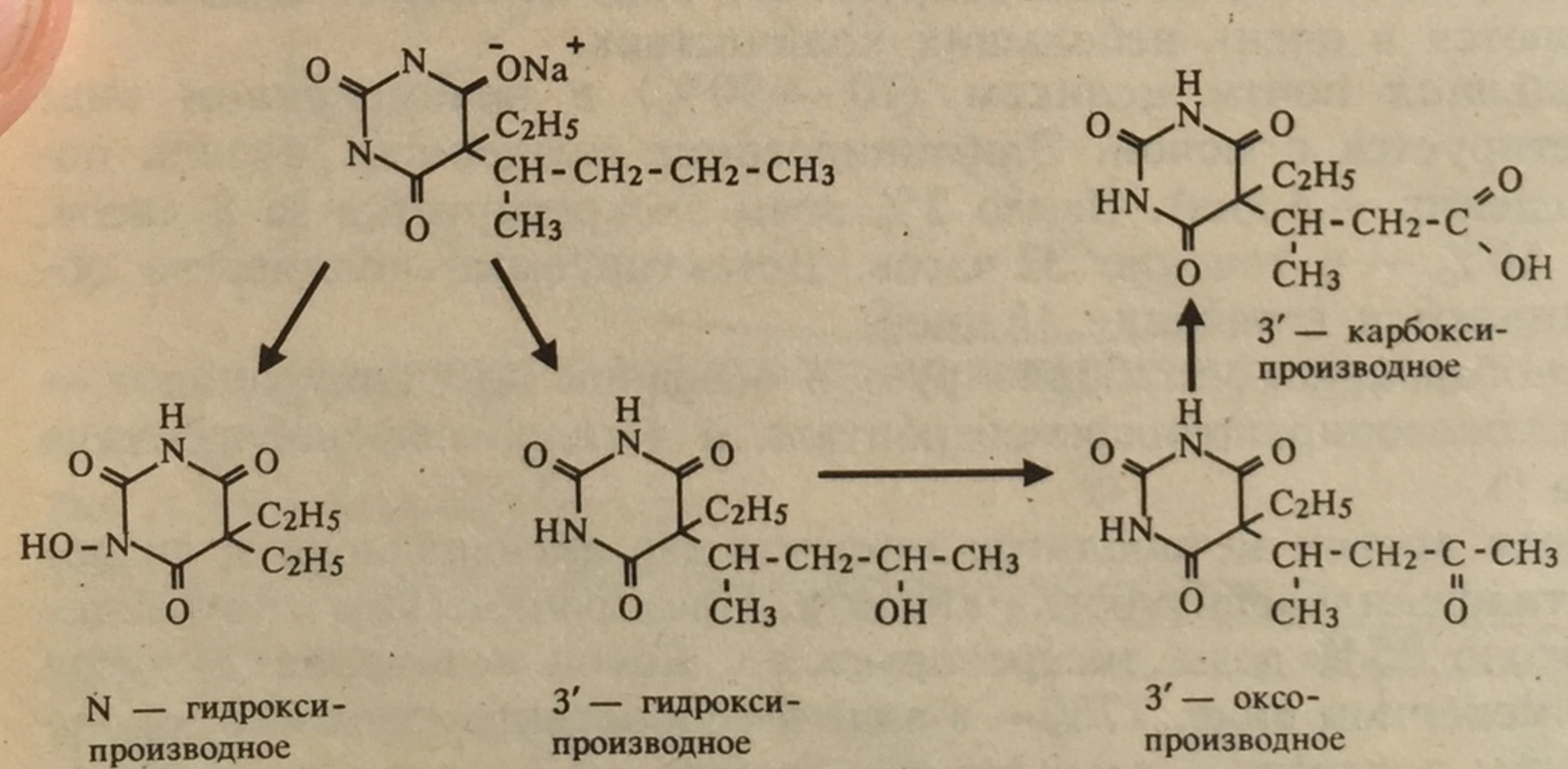


Схема 2

Барбамил экскретируется с мочой за 6 дней (80 — 90% дозы). Важнейший метаболит (30 — 50%) — 3-гидроксипроизводное (см. этаминал натрия) и N-глюкуронид (30%), около 1% — в неизмененном виде. В моче также может детектироваться 3-карбоксипроизводное (схема 3).

МЕТАБОЛИЗМ БАРБАМИЛА

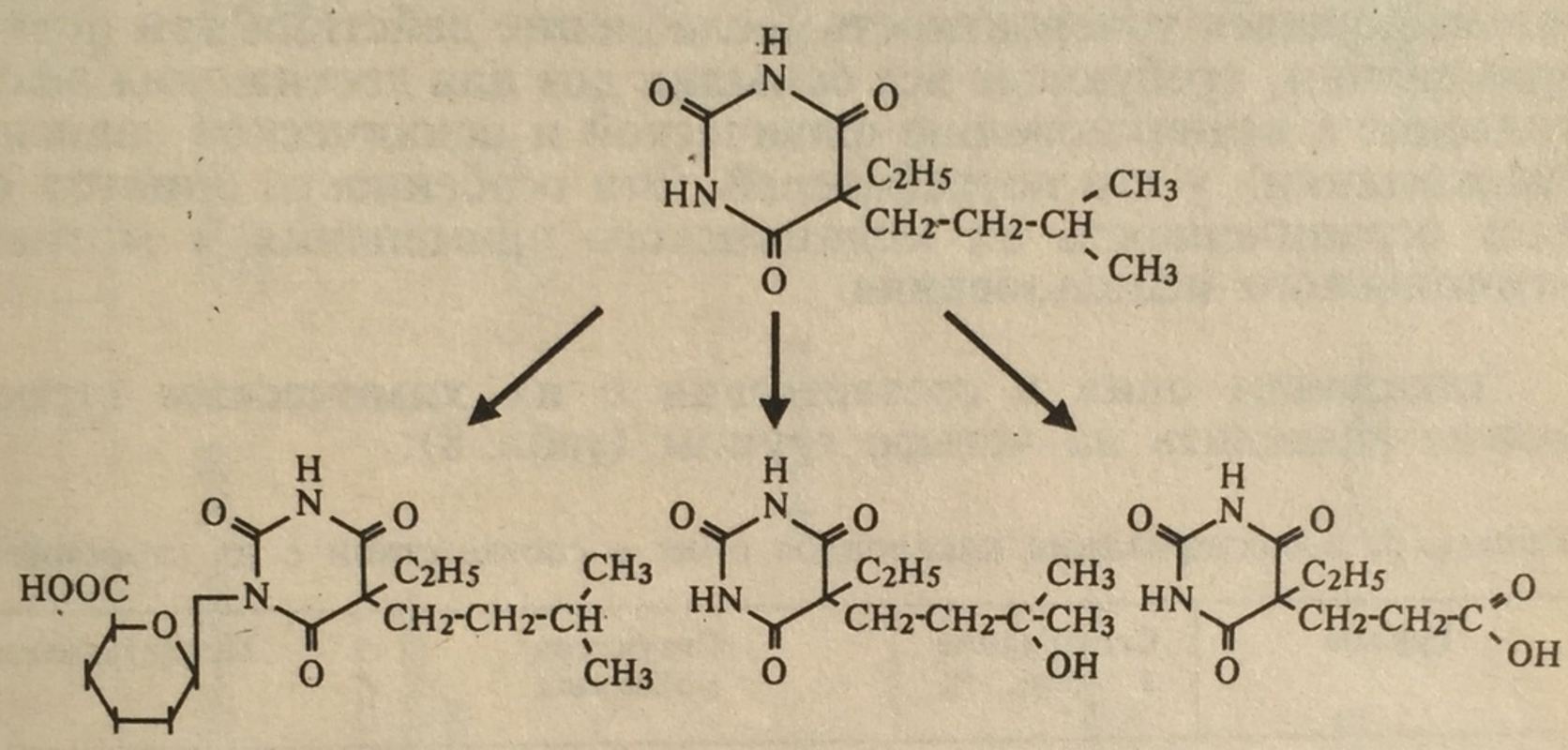
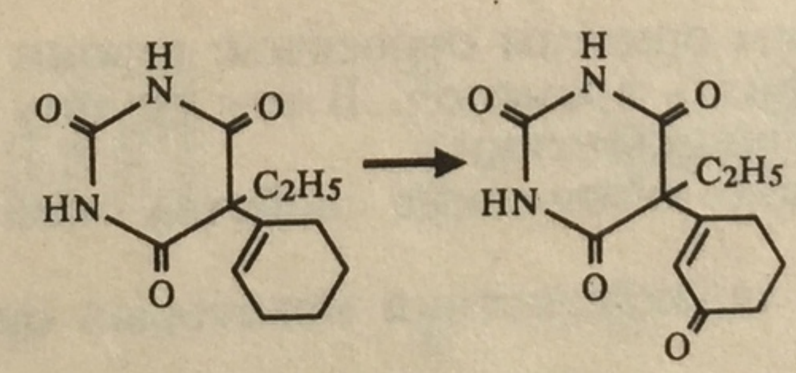


Схема 3

Циклобарбитал быстро поглощается после орального введения. Основная метаболическая реакция — окисление в кетоциклобарбитал. Менее чем 10% выводится с мочой в неизмененном виде.



3.2. ОПИАТЫ

Термином "опиаты" обозначают природные и синтетические вещества с морфиноподобными анальгезирующими свойствами, влияющими на ЦНС и гладкие мышцы. Морфин, основной алкалоид опия, служит стандартом для оценки других опиатов.

Особое влияние опиатов на ЦНС, вызывающее эйфорию, и развивающаяся толерантность (ослабление действия при повторном применении, требующее все больших доз для достижения эффекта) приводят к возникновению физической и психической зависимости (наркомании) у его потребителей. Эта особенность опиатов объясняет ограниченность их медицинского применения и мотивы немедицинского использования.

Алкалоиды опия в соответствии с их химическим строением можно разделить на четыре группы (табл. 8).

Таблица 8. **Классификация алкалоидов опия в соответствии с их строением**

Группа	Содержание в опии, %	Структура молекулы	Представители
Морфина	3 — 23	Фенантреновый цикл	Морфин Кодеин Тебаин Псевдоморфин Неопин
Папаверина	0,5 — 1,3	Бензилизохинолиновый цикл	Папаверин Лауданозин Некоторые другие минорные алкалоиды
Наркотина	2,0 — 8,0	Фталилизохинолиновый цикл	Наркотин Нарцеин
Протопина	Мало		Протопин Криптопин

К синтетическим опиатам относятся: героин (диацетилморфин), дионин (этилморфин), промедол. В эту группу можно включить и некоторые другие анальгетики.

Основные физико-химические свойства опиатов представлены в табл. 9.

Спектральные характеристики некоторых опиатов приведены в табл. 10, 11, 12.

Таблица 9. **Физико-химические свойства опиатов**

Вещество	Тпл°С—H_2O	Тпл°С	Растворимость (1 г в мл растворителя)						pK_a pK_{a1} pK_{a2}	lgP
			Вода	Этанол	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Бензол	Прочие		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Морфин										
основание	123	254-256 (разл.)	5000	250	1500	6250-7630	1600	глицерин 250	амфолит pK_{a1} 9,9 pK_{a2} 8,0	0,1 (в октаноле при pH=7,4)
гидрохлорид	77	200 (разл.)	24	100	нерастворим	нерастворим				
сульфат		250 (разл.)	21	1000	»	»		метанол 77		
ацетат			2,5	100						
тартрат			10	1000						
Кодеин										
основание	8	154-158	120	2	0,5-2,0	50	растворим		8,2	0,6 (в октаноле при pH=7,4)
гидрохлорид	100	280 (разл.)	30	100	800					
сульфат		278 (разл.)	30	1300	нерастворим	нерастворим				
фосфат		225-240	0,5 (100°С)	450	»	»				
Тебаин										
основание		193	1500	10	13	200	растворим		8,15-8,20	0,3 (в октаноле при pH=7,5)

Продолжение табл. 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
гидрохлорид			умеренно	мало	растворим					
Героин										
основание		170-173	1700	31	100	1,5			7,8-8,1	0,2 (в эфире при pH=7,0)
гидрохлорид	100	229-233	1,6	12	1,6	нерастворим				
Этилморфин										
основание		199-201							7,9-8,2	
гидрохлорид		123 (разл.)	12	25	250	нерастворим				

Таблица 10. **Спектры поглощения в УФ-области**

Вещество	Растворитель	$\lambda_{макс}$, нм	$E_1^{1\%}$ см
Морфин	0,1 н HCl	285	50
	0,1 н NaOH	205	202
		298	100
Кодеин	этанол	286	50
	0,1 н HCl	211	825
		285	54
	0,1 н NaOH	284	49
Кодеина фосфат	вода	284	52,8
Тебаин	0,1 н HCl	284	270
	0,1 н NaOH	284	253
Героин	0,1 н HCl	278	39
	0,1 н H_2SO_4	279	52
	этанол	281	54
	0,1 н NaOH	278	47

Таблица 11. **Инфракрасные спектры**

Вещество	Основные полосы поглощения, $см^{-1}$
Морфин	805, 1243, 1118, 945, 1086, 833
Кодеин	1052, 1268, 1500, 1111, 793, 934
Тебаин	1234, 1605, 1144, 1270, 1030, 910
Героин	1245, 1764, 1178, 1215, 911, 1736

Примечание. Приведены шесть наиболее важных полос поглощения. Спектры сняты в калий бромиде (1 мг вещества в 250 мг калия бромида).

Таблица 12. **Характеристические полосы масс-спектра электронного удара**

Вещество	m/z*
Морфин	285, 162, 42, 215, 286, 124, 44, 284, 268
Кодеин	299, 42, 162, 124, 229, 59, 300, 69
Тебаин	311, 255, 42, 44, 206, 310, 312, 174
Героин	341, 282, 229, 42, 43, 59, 342, 204
Норморфин	271, 81, 150, 201, 148, 110, 272, 82
Норкодеин	285, 81, 215, 148, 286, 164, 110, 115

* Даны в порядке убывания интенсивности; молекулярный ион подчеркнут.

3.2.1. Фармакокинетика и метаболизм опиатов

Морфин. При внутривенном введении морфина максимальный фармакологический эффект достигается через несколько минут, при подкожном и внутримышечном введении — через 15 минут. В дальнейшем содержание морфина в крови резко падает; так, при внутривенном введении последнего концентрация

его в крови составляет соответственно: через 2 часа — 0,04 — 0,10 мкг/мл и через 12 часов — 0,002 — 0,007 мкг/мл. Около 80% морфина от введенной дозы выделяется с мочой в течение 8 часов. Однако следы морфина можно обнаружить в моче даже спустя 72 — 100 часов.

Время полувыведения (T1/2) для морфина составляет 2 — 3 часа, объем распределения (Vd) — 3 — 5 л/кг, клиренс (Cl) — 15 — 20 мл/мин/кг, процент связывания с белками плазмы — 20 — 35%.

Основные пути метаболизма морфина — конъюгирование с глюкуроновой и серной кислотами с образованием морфин-3- и морфин-6-глюкуронидов, а также 6- и 3-сульфатных конъюгатов. В процессе реакций N-деметилирования образуется норморфин, 3-0-метилирования — кодеин, N-окисления — N-оксид (схема 4).

МЕТАБОЛИЗМ МОРФИНА

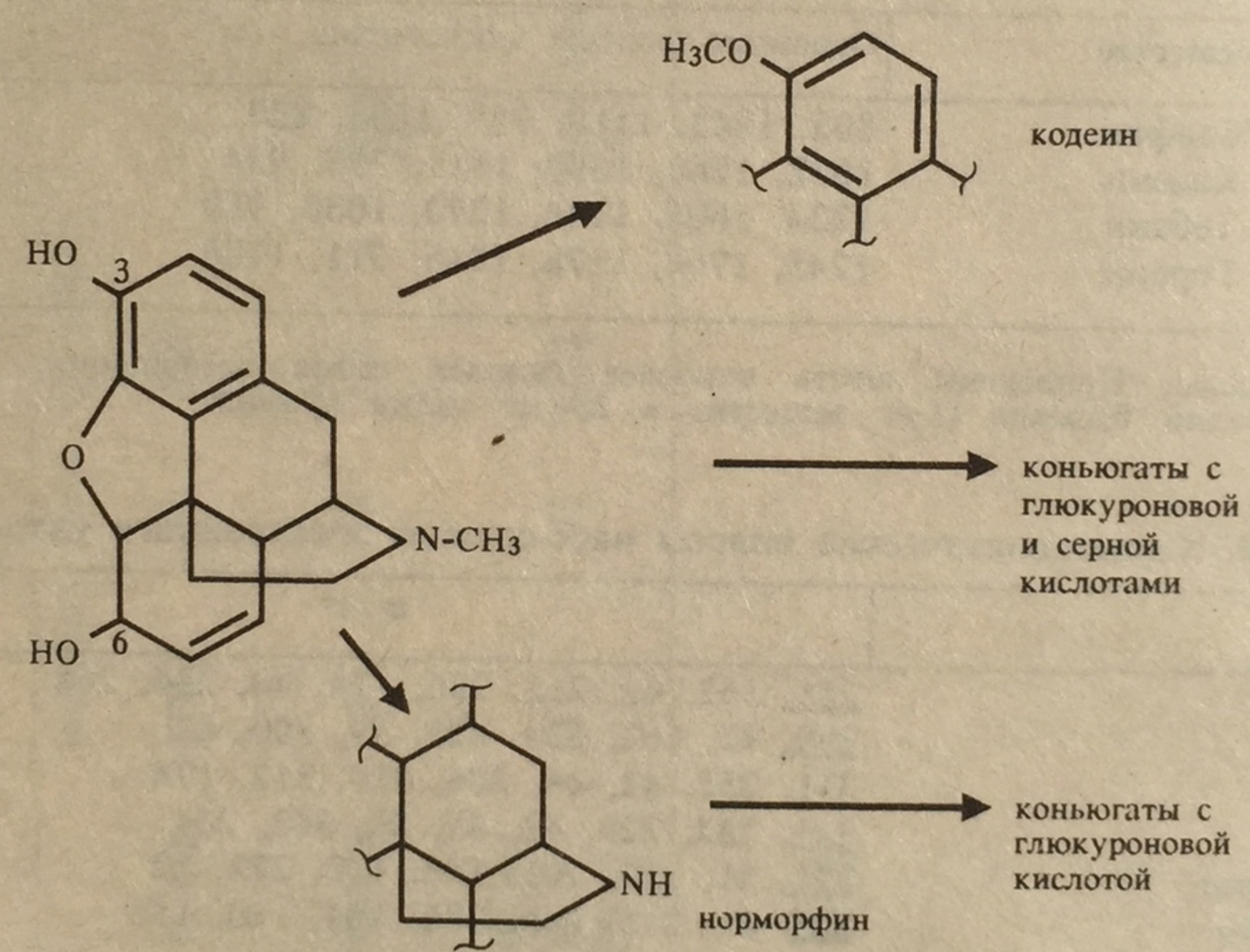


Схема 4

После парентерального введения морфина за 24 часа выделяется с мочой до 85 — 90% дозы: 2 — 12% — в виде свободного морфина, 65 — 70% — морфин-3- и морфин-6-глюкуронидов, до 10% — сульфатных конъюгатов, 1% — норморфина и 3% — норморфина-глюкуронида. При оральном приеме через 24 часа с мочой выводится 64 — 90% дозы, причем менее 3% нативного морфина.

Соотношение свободного и связанного (сумма 6- и 3-глюкуронидов) морфина в крови спустя 1 — 3 часа после приема препарата изменяется от 1:20 до 1:28, при этом морфина-3-глюкуронида образуется примерно в 7 раз больше, чем морфина-6-глюкуронида.

С желчью выделяется до 10% введенной дозы. При многократном приеме морфина он накапливается в волосах и ногтях.

Кодеин. Кодеин всасывается достаточно быстро после парентерального введения. В случае орального приема максимальная концентрация в крови устанавливается спустя 1 час. Время полувыведения кодеина 3 — 4 часа, объем распределения — 3,5 л/кг (по другим данным — 5 — 10 л/кг), клиренс — 10 — 15 мл/мин/кг, связывание с белками плазмы — 7 — 25%.

Метаболитические превращения кодеина протекают главным образом в печени. Основными реакциями являются: конъюгирование с глюкуроновой кислотой, O- и N-деметилирование. Основные продукты метаболизма соответственно: 6-0-глюкуронид кодеина, норкодеин и морфин и конъюгаты двух последних метаболитов (схема 5). В следовых количествах образуется гидрокодон, норгидрокодон, 6α- и 6β-гидрокодол.

МЕТАБОЛИЗМ КОДЕИНА

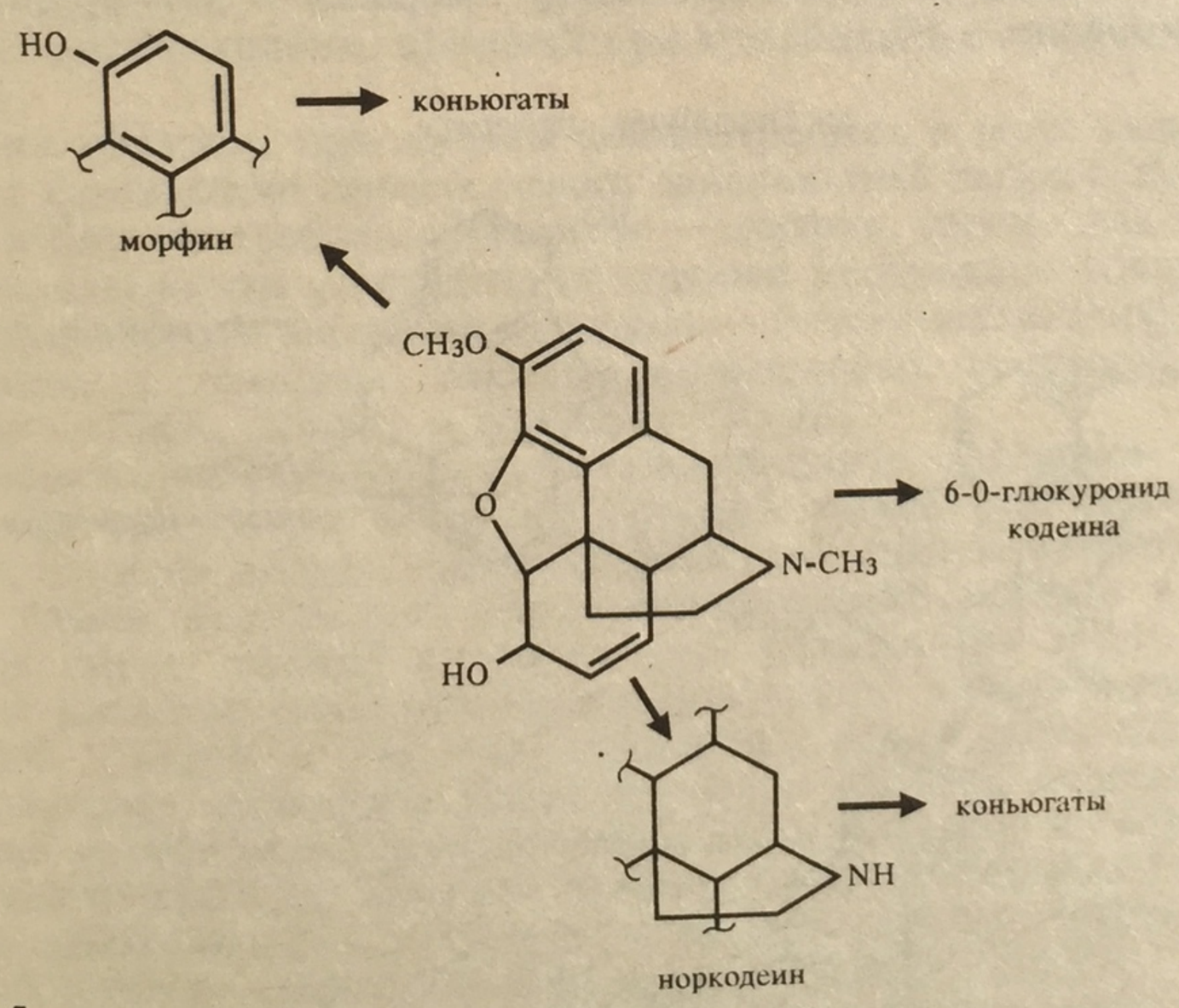


Схема 5

В случае приема терапевтических доз кодеина в интервале 20 — 40 часов количество морфина в моче начинает превышать количество кодеина. В этом же интервале времени норкодеин присутствует только в следах.

ство кодеина. В этом же интервале времени норкодеин присутствует только в следах.

После орального приема около 86% дозы выделяется с мочой за 24 часа, в том числе свободного и конъюгированного кодеина — 40 — 70%, свободного и конъюгированного морфина —5 — 15%, свободного и конъюгированного норкодеина — 10 — 20%. При внутримышечном введении количество свободного кодеина, выделяемого с мочой спустя 24 часа, составляет 15 — 20%.

В моче с более кислым значением pH количество свободного кодеина возрастает от 6 — 8 до 10%.

Героин. Диацетилморфин (героин) — короткоживущий и быстродействующий наркотический анальгетик. Он менее полярен, чем морфин, имеет высокую липидную и мембранную растворимость, что объясняет его быстрое всасывание и легкость прохождения гематоэнцефалического барьера. В крови героин быстро гидролизуется до 6-0-моноацетилморфина, а затем до морфина. Период полувыведения героина составляет 3 минуты. Основные метаболиты героина — 6-0-моноацетилморфин, морфин и морфин-3-глюкуронид. В небольших количествах также обнаружены: норморфин, его глюкуронид, морфин-6-глюкуронид, дигидроморфинон, 6-ацетил-3-глюкуронид, норкодеин (схема 6).

До 80% введенной дозы героина выделяется с мочой за 24 часа (морфин-3-глюкуронид — 50 — 60%, морфин — 5 — 7, 6-0-моноацетилморфин — 1%).

МЕТАБОЛИЗМ ГЕРОИНА

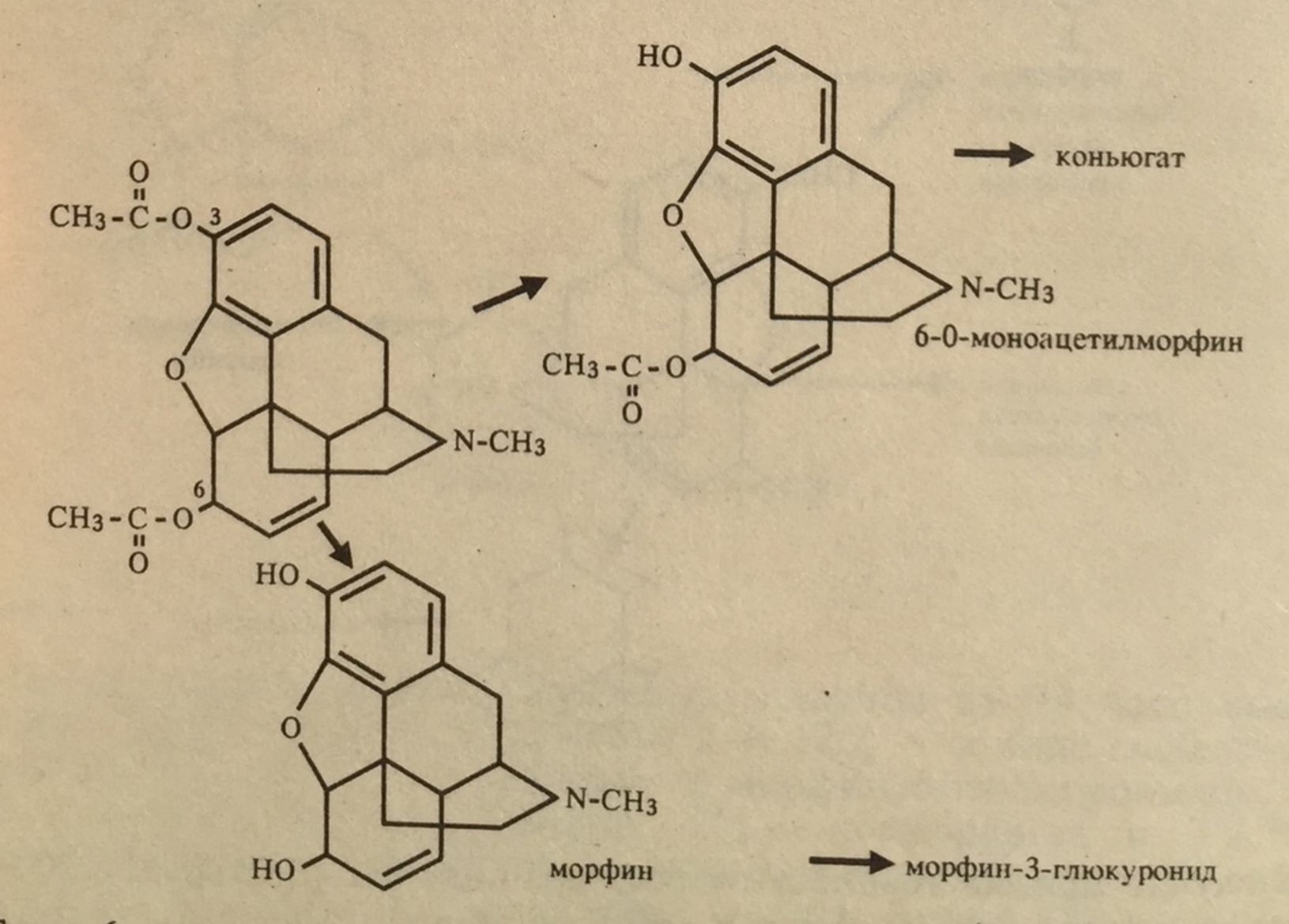


Схема 6

При четырехкратном приеме героина (доза — 10 мг/70 кг) спустя 24 часа после первого приема в моче найдено: общего морфина — 54%, морфина — 7,2, 6-0-моноацетилморфина — 1,5, общего норморфина — 4%.

По результатам анализа можно сделать некоторые выводы о лекарственном или нелекарственном употреблении опиатов. Иммунные методы не различают опиатов и их глюкуронидов и представляют результат суммарного, группового определения, поэтому для получения данных о конкретных соединениях необходимо проведение подтверждающих исследований.

Присутствие в пробе мочи только одного морфина или его конъюгата указывает на использование чистого лекарственного препарата морфина или на злоупотребление героином одним или двумя днями ранее.

Присутствие в моче одновременно морфина и кодеина может свидетельствовать о лекарственном употреблении кодеина, в этом случае концентрация кодеина выше, чем морфина. В общем использование терапевтических доз кодеина (30 мг) дает возможность детектировать свободный морфин или кодеин только в течение нескольких часов после употребления, хотя другие метаболиты обнаруживаются спустя два-три дня после введения. Присутствие кодеина в значительных количествах может указывать на злоупотребление препаратом.

Следует также иметь в виду, что кустарно произведенный героин содержит в качестве примеси (иногда в заметных количествах) ацетилкодеин, который при метаболизме также образует кодеин.

Таким образом, при низких концентрациях в моче морфина и кодеина невозможно сделать строго однозначный вывод о продукте, который был употреблен субъектом,— морфин, героин или кодеин. Для доказательства употребления героина необходимо обязательно идентифицировать метаболит героина — 6-моноацетилморфин, что достигается с помощью высокочувствительных подтверждающих методов — ГЖХ, ВЭЖХ и особенно ГХ/МС.

Обнаружение опиатов в растительном сырье, таблетках, порошках и др. проводят с помощью реакций окрашивания реактивом Марки, хлорида железа, концентрированной азотной кислоты. Причем с солью железа дает окрашивание только морфин и растительное сырье, кодеин и героин этой реакции не дают. Тест с азотной кислотой позволяет предположительно отличить героин от морфина и кодеина. Так, при добавлении капли азотной кислоты к небольшому количеству анализируемого порошка медленное изменение желтой окраски до светло-зеленой указывает на возможное присутствие героина; быстрый переход оранжевой окраски в красную и затем медленно в желтую — на присутствие морфина; медленный переход оранжевой окраски в желтую — кодеина.

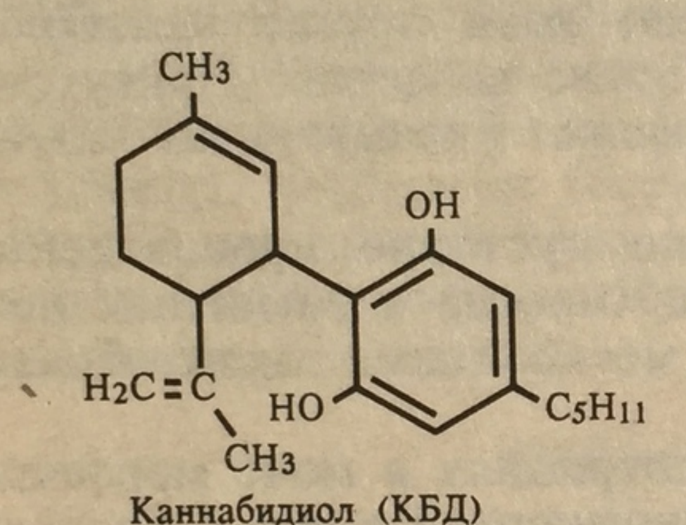
Учитывая, что в неизмененном виде опиаты выделяются с мочой в очень небольших количествах, перед проведением предваритель-

ного исследования мочу подвергают кипячению с кислотой для разрушения конъюгатов, тем самым повышая концентрацию нативных соединений. Опиаты экстрагируют из мочи смесью хлороформ — изопропанол (9 : 1) при pH = 9—10.

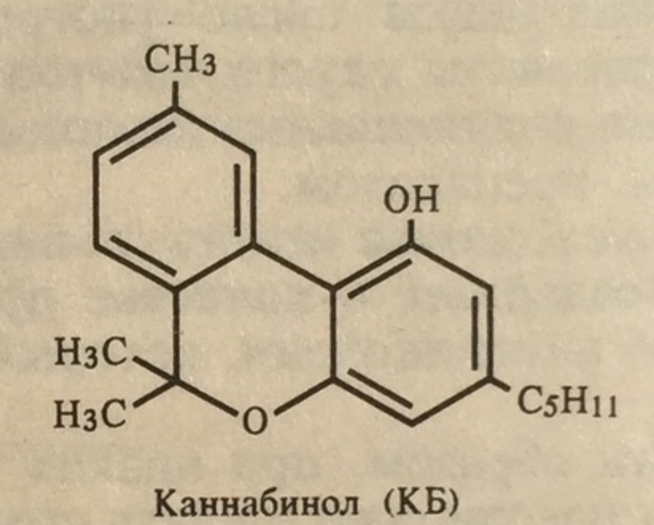
3.3. КАННАБИНОИДЫ

В данную группу наркотических веществ входят препараты, приготовленные из различных частей конопли, наиболее распространенные: марихуана (смесь листьев, соцветия), гашиш (смолка, гашишное масло). Однако наркоманами используются практически все части растения.

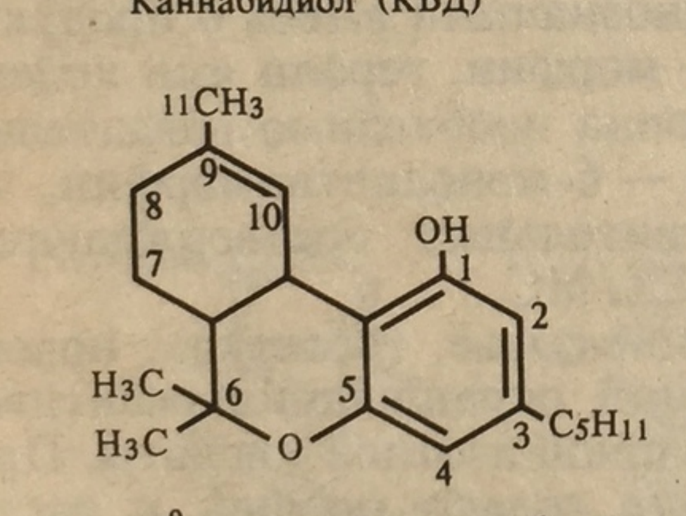
В смолке содержится около 30 различных каннабиноидов. Наиболее важные из них — это каннабидиол (КБД), каннабинол (КБ), (—)- транс- Δ^9 -тетрагидроканнабинол (Δ^9 -ТГК), (—)-транс- Δ^8 -тетрагидроканнабинол (Δ^8 -ТГК) и Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота (Δ^9 -ТГК-кислота).



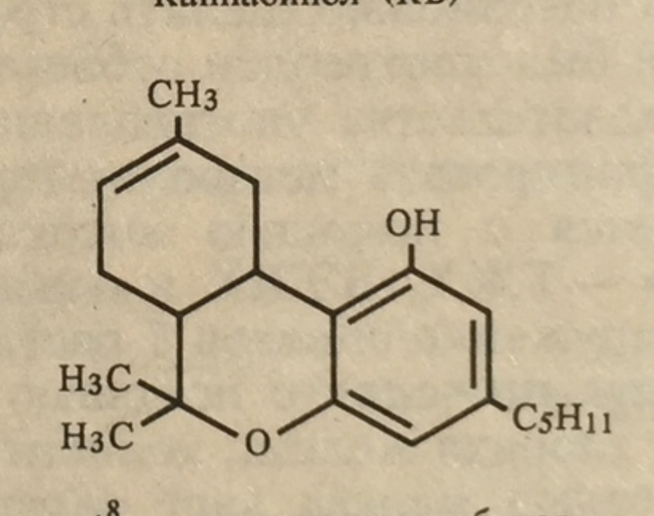
Каннабидиол (КБД)



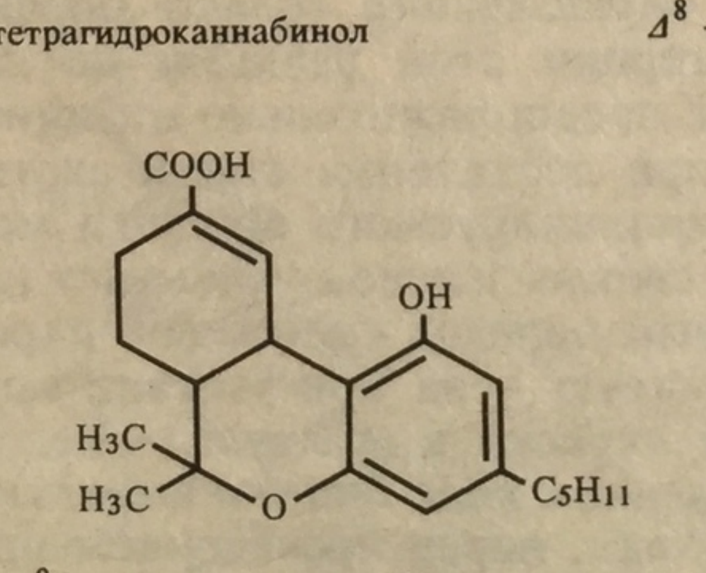
Каннабинол (КБ)



Δ^9 — тетрагидроканнабинол



Δ^8 — тетрагидроканнабинол



Δ^9 — тетрагидроканнабиноловая кислота

Уровень Δ^9-ТГК в марихуане составляет 0,5 — 5%, в гашише (смола) — 2 — 10 и в гашишном масле —10 — 30%.

3.3.1. Физико-химические свойства

Δ^9-ТГК и Δ^9-ТГК-кислота имеют температуры кипения соответственно 200 и 210 — 213°С. Данные вещества хорошо растворяются в этаноле, ацетоне. Растворимость Δ^9-ТГК в воде — 3 мг/л. Δ^9-ТГК-кислота ограниченно растворяется в хлороформе и диэтиловом эфире и практически нерастворима в воде, бензоле, петролейном эфире. Δ^9-ТГК относится к слабым кислотам и имеет величину pK_a, равную 10,6.

Спиртовые растворы Δ^9-ТГК и Δ^9-ТГК-кислоты имеют характерные спектры поглощения в УФ-области с максимумами соответственно 283, 276 и 283, 278 нм.

3.3.2. Фармакокинетика и метаболизм каннабиноидов

При курении каннабиноиды быстро (за несколько минут) всасываются. При этом возрастает содержание физиологически активных компонентов — КБ и Δ^9-ТГК — вследствие разложения КБД. Уровень Δ^9-ТГК в крови быстро нарастает, достигая максимальных концентраций через 5 — 30 минут, и быстро снижается из-за активных метаболитических процессов и распределения веществ в тканях.

При пероральном введении из-за плохой всасываемости в желудочно-кишечном тракте концентрация Δ^9-ТГК в крови нарастает медленно, достигая максимальных значений через 1,5 — 3 часа. Часть вещества, минуя большой круг кровообращения, депонируется и метаболизируется в печени.

Степень абсорбции Δ^9-ТГК при курении и пероральном введении индивидуальна и составляет соответственно 2 — 56 и 6 — 20%.

Δ^9-ТГК распределяется в большей степени в тканях, богатых липидами (в печени, почках, легких, мозге; долгое время задерживается печенью, селезенкой и костным мозгом).

При хроническом приеме Δ^9-ТГК депонируется в жировой ткани. Более полярный активный метаболит 11-гидрокси- Δ^9-ТГК показывает меньшую тенденцию к накоплению, а 8, 11-дигидрокси- Δ^9-ТГК сохраняется долгое время в липидах и в печени.

Метаболизм каннабиноидов осуществляется преимущественно в печени и достаточно интенсивно. Обнаружено около 50 метаболитов веществ — компонентов конопли. Пути метаболизма, подчиняясь общим закономерностям, однако, имеют видовые и индивидуальные особенности и различны в разных тканях.

Метаболизм Δ^9-ТГК приведен в схеме 7.

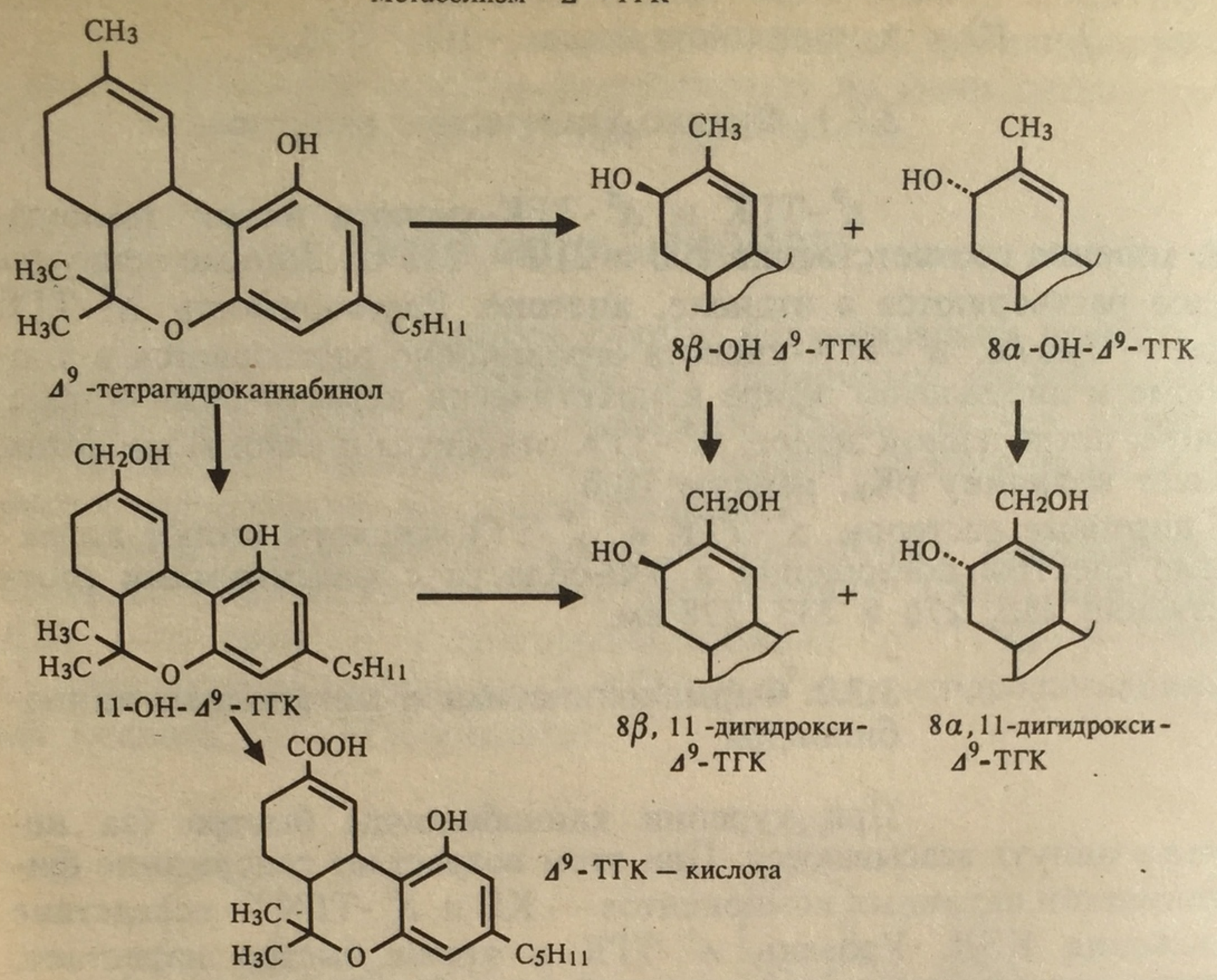


Схема 7

Основным неактивным метаболитом Δ^9-ТГК является 11-нор-карбокси-Δ^9-ТГК и ее конъюгат с глюкуроновой кислотой. Первичный метаболит — продукт окисления по С-11 — 11-гидрокси-Δ^9-ТГК — является более активным, чем исходное вещество. Также активен 8β-гидрокси-Δ^9 ТГК.

Выведение метаболитов происходит с мочой, калом, секретом слюнных и молочных желез.

Для Δ^9-ТГК примерно 80 — 90% дозы выводится за пять дней после приема, причем около 20% экскретирует с мочой и 65% — с калом. Количество выводимого вещества зависит от дозы и путей выведения.

Степень выведения Δ^9-ТГК зависит от путей введения (табл. 13, измерение) в первые сутки после приема разовой дозы.

Таблица 13. **Выведение Δ^9-ТГК при разных путях введения (%)**

Путь введения	Моча	Кал
Парентерально	15 — 25	37 — 45
Перорально	10 — 20	34 — 44
Ингаляционно	5 — 15	Неизвестно

С мочой каннабиноиды выводятся в виде метаболитов, основным из которых является ТГК-кислота, на 80% связанная с глюкуроновой и серной кислотами. С фекалиями в большей степени выводится Δ^9-ТГК и ТГК-кислота, конъюгированная с желчными и жирными кислотами.

Анализ каннабиноидов представляет собой определенные трудности вследствие их высокой липорастворимости и низкой концентрации в анализируемых биожидкостях — моче и крови. Поэтому более часто содержание каннабиноидов устанавливается в смывах рук и ротовой полости курильщиков.

Наиболее простым и чувствительным методом обнаружения каннабиноидов являются иммунохимические методы, которые детектируют не только важнейший метаболит — Δ^9-ТГК-кислоту, но и другие метаболиты. У хронических наркоманов в моче иммуноферментным методом определяется более 20 нг/мл в течение месяца (от 4 до 77 дней), а у "легких" потребителей— в среднем 13 дней (от 3 до 29 дней) после последнего употребления.

Более селективные методы — ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ/МС — используются в качестве подтверждающих методов. Метод ТСХ обычно используется при анализе смывов с пальцев рук, ладоней, губ, полости рта, т.е. в местах, где конденсируются продукты курения. Смывы производят с помощью ватного или марлевого тампона, смоченного этиловым спиртом.

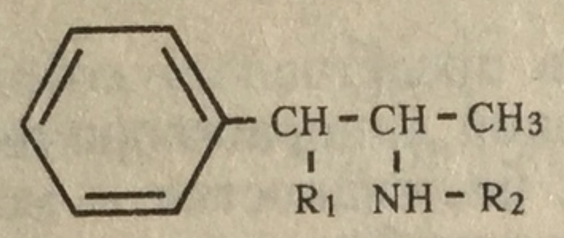
Из материала тампона каннабиноиды экстрагируют органическим растворителем — этилацетатом, гексаном, петролейным эфиром. Экстракт упаривают до конечного объема 0,1 — 0,3 мл и используют для предварительного обнаружения с помощью цветных реакций и методом ТСХ. Хроматографирование осуществляется в системе "петролейный эфир (40 — 70°С)— диэтиловый эфир (4:1)" двукратно. Обнаружение производят опрыскиванием хроматограммы 0,5%-ным раствором прочного синего Б или ББ в 10%-ном растворе карбоната натрия. Величина R_f каннабинола равна 0,76, тетрагидроканнабинола — 0,84.

Следует иметь в виду, что обнаружение каннабиноидов только в смывах не является подтверждением, что данное лицо курило гашиш.

3.4. ФЕНИЛАЛКИЛАМИНЫ

Фенилалкиламины являются стимуляторами центральной нервной системы, симпатомиметиками, некоторые вещества широко используются в медицине (эфедрин — α-, β-адреностимулятор, вызывает сужение сосудов, повышает артериальное давление), в спорте — в виде запрещенных допинговых средств и психомоторных стимуляторов (амфетамин, метамфетамин), как наркотическое средство (эфедрон). Длительность действия фенилалкиламинов примерно одинакова — около 4 — 6 часов.

По своим физико-химическим свойствам фенилалкиламины относятся к веществам основного характера. Общая формула:



В виде оснований данные вещества (кроме эфедрина) представляют собой маслянистые труднолетучие жидкости.

Их соли с соляной и серной кислотами — белые или слегка кремоватые порошки или кристаллы, легко растворимые в полярных растворителях (воде, этаноле, метаноле) и практически нерастворимые в хлороформе, эфире.

Вещества обладают оптической активностью: различают левовращающие (L) рацематы (L, D) и правовращающие (D) изомеры, отличающиеся формой кристаллов, растворимостью, температурой плавления.

УФ-спектры фенилалкиламинов в водно-кислой среде имеют тонкую колебательную структуру, характерную для бензольного поглощения (табл. 14).

Таблица 14. **УФ-спектральные характеристики фенилалкиламинов**

Вещество	Водный раствор, pH-1	
	ε_a	λ (макс), нм
Амфетамин	14	251 257* 263
Метамфетамин	12,1	251 257 263
Эфедрин	12	251 257 263
Норэфедрин	11,7	251 257 262
Эфедрон	878	251

* Подчеркнут основной пик УФ-спектра.

Основные характеристические частоты ИК-спектров приведены в табл. 15.

Таблица 15. **Основные характеристические частоты ИК-спектров фенилалкиламинов, см$^{-1}$**

Амфетамин	Метамфетамин	Эфедрин	Норэфедрин	Эфедрон	Тип колебаний и связь
700	698	699	700	702	=C—H (деформационные)
740	747	754	746	757	(монозамещ. бензола
825	1060	760	1030		и
1090	1085	994	1055		—C—H алкильного радикала)
		1049			
		1242	1201		—C—O (валентные)
1495	1491	1400	1500	1510	—C=C — ароматического кольца
1605	1590	1480	1590	1590	
		1605			
				1695	—C—O (валентные)

3.4.2. Фармакокинетика и метаболизм фенилалкиламинов

Все фенилалкиламины быстро всасываются в желудочно-кишечном тракте после орального введения, максимальная концентрация в крови достигается через 2 — 3 часа. За 24 часа выводится с мочой 70 — 90% вещества, полностью экскретируется за 2 — 3 дня.

Значение pH мочи значительно влияет на метаболизм и период полувыведения из плазмы крови:

— при кислом значении максимален выход вещества в неизмененном виде с увеличением периода полувыведения;

— при щелочном значении увеличивается процент метаболитов и снижается период полувыведения. В табл. 16 приведены основные фармакокинетические параметры фенилалкиламинов.

Таблица 16. **Основные фармакокинетические параметры фенилалкиламинов**

Вещество	pK_a	Концентрация в плазме, мкг/мл			$T_{1/2}$, ч	Выделение в неизмененном виде, %
		терапев.	токсич.	летальн.		
Амфетамин	9,9	0,1	0,2 — 3,0	до 41,0	8 — 12	30 — 70
Метамфетамин	10,1	0,01 — 0,05	0,1 — 2,0	до 43,0	9	45
Эфедрин	9,6	0,035 — 0,08	0,15 — 10,0		3 — 11	55 — 75
Норэфедрин	9,4	0,05 — 0,12	до 50,0		4	90
Эфедрон	9,0		0,2 — 30,0		3 — 8	15 — 20

Примечание. pK_a — константа ионизации; $T_{1/2}$ — период полувыведения.

МЕТАБОЛИЗМ АМФЕТАМИНА

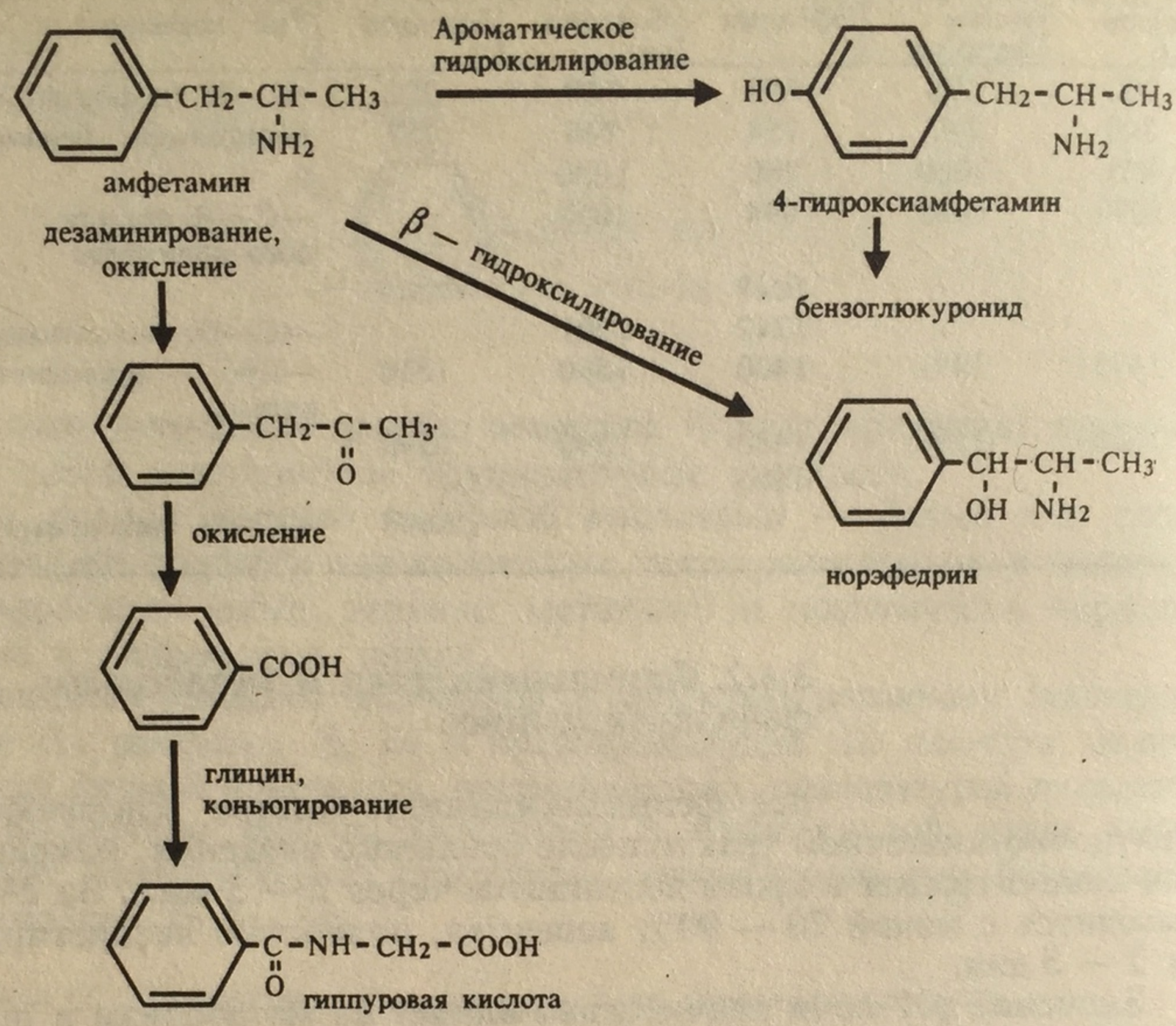


Схема 8

Амфетамин в неизмененном виде экскретируется с мочой лишь на 30%. В качестве его метаболитов определяются: 16 — 28% — гиппуровая кислота, 4% — бензоглюкуронид, 2 — 4% — 4-гидроксиамфетамин, 2% — норэфедрин (схема 8).

Метамфетамин — в неизмененном виде с мочой выделяется около 45%. Основные метаболиты: 5% — амфетамин, 15% — 4-гидроксиметиламфетамин (схема 9).

Эфедрин — в неизмененном виде выделяется 55 — 75%. Основными метаболитами являются: 8 — 20% — норэфедрин, 4 — 13% — безаминные метаболиты (бензойная и гиппуровая кислоты, фенилпропандиол). При щелочной моче выведение эфедрина снижается до 20 — 35%, соответственно увеличивается содержание норэфедрина (схема 10).

Норэфедрин — в неизмененном виде выделяется практически полностью — 90%. В качестве метаболитов обнаруживают малые количества амфетамина, эфедрина, диэтилпропиона.

Эфедрон — в неизмененном виде выделяется 20 — 30% в течение 12 — 16 часов. Основной его метаболит — эфедрин (50 — 60%), который можно обнаружить через 24 — 36 часов после упот-

МЕТАБОЛИЗМ МЕТАМФЕТАМИНА

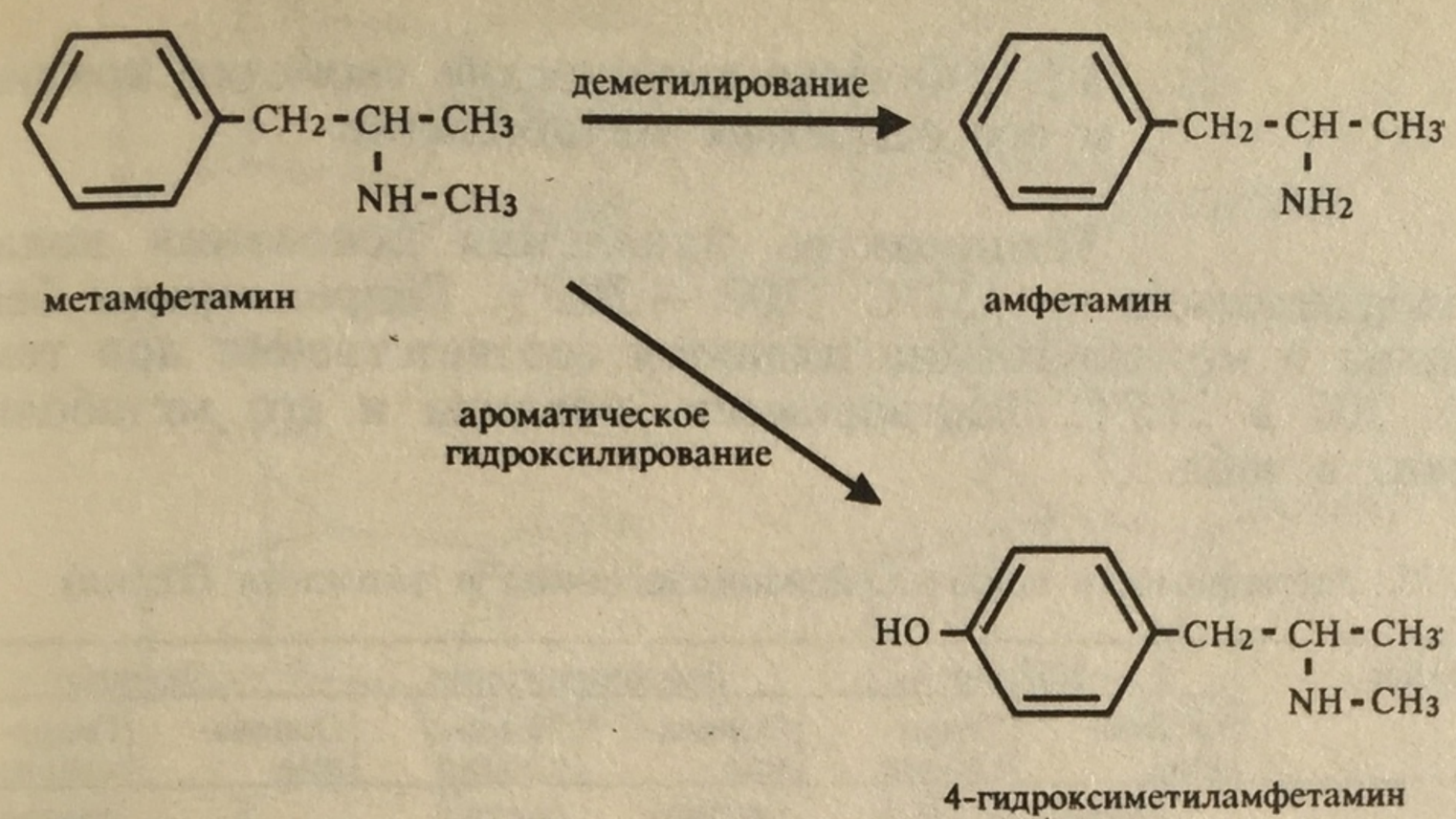


Схема 9

МЕТАБОЛИЗМ ЭФЕДРИНА

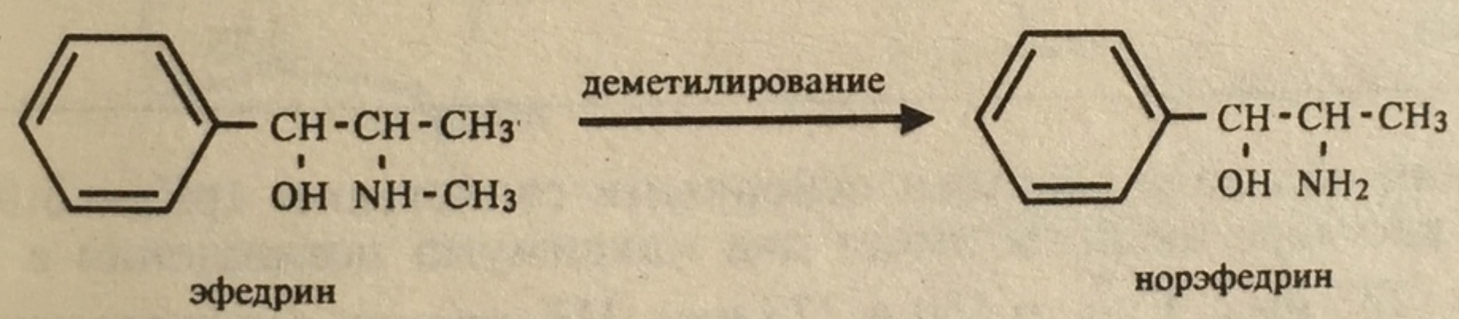


Схема 10

ребления. Присутствуют также небольшие количества норэфедрина и метаболита неустановленного строения (схема 11).

МЕТАБОЛИЗМ ЭФЕДРОНА

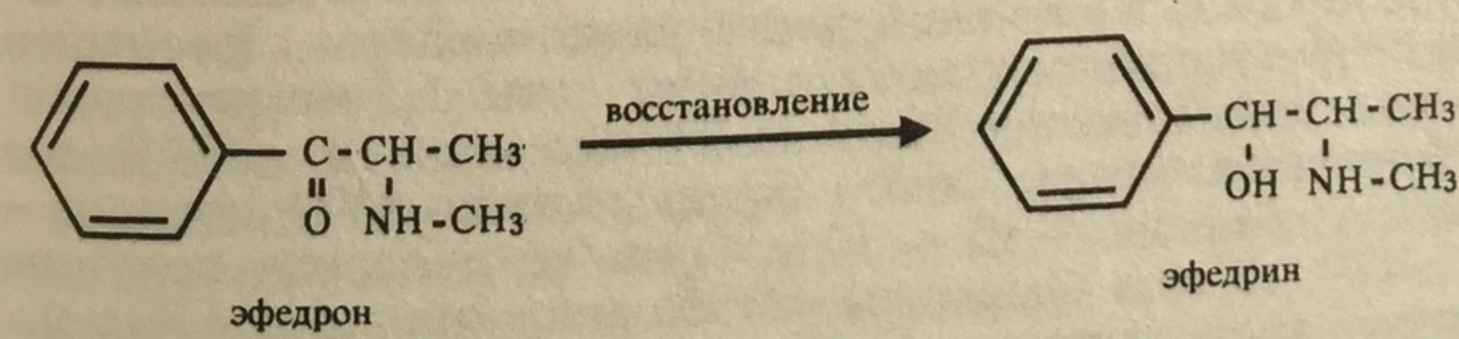


Схема 11

3.5. КОКАИН

3.5.1. Физико-химические свойства кокаина и его основных метаболитов

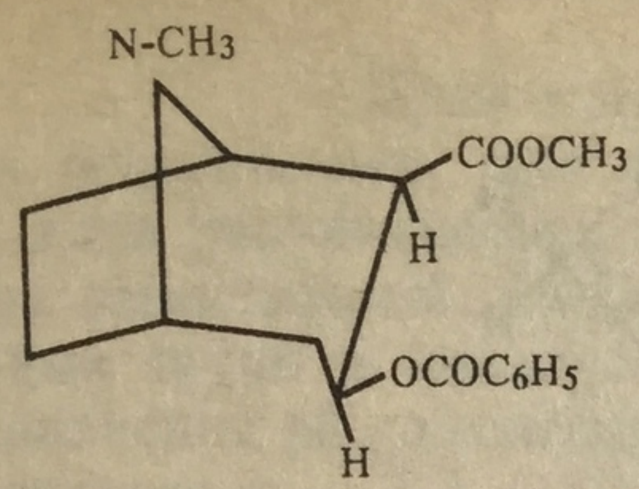
Температура плавления основания кокаина 98°С, гидрохлорида — 157°С (200 — 202°). Гидрохлориды бензоилэкгонина и метилэкгонина плавятся соответственно при температурах 200 и 215°С. Растворимость кокаина и его метаболитов приведена в табл. 17.

Таблица 17. **Растворимость кокаина, бензоилэкгонина и экгонина (1г/мл)**

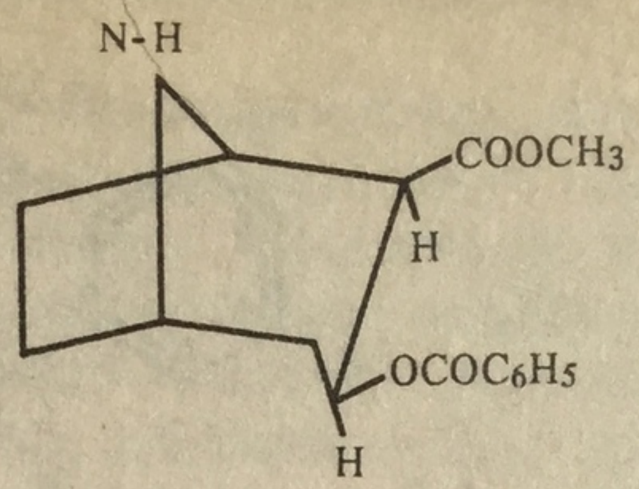
Растворитель	Кокаин		Бензоилэкгонин		Экгонин	
	Основание	Гидрохлорид	Основание	Гидрохлорид	Основание	Гидрохлорид
Вода	1300	0,5	растворим	растворим	5	растворим
Этанол	7	4,5	растворим	растворим	67	слабо
Диэтиловый эфир	4	нерастворим				
Хлороформ	0,5	18				
Этилацетат					75	

Кокаин обладает слабыми основными свойствами ($pK_a = 8,6$). В водном растворе кислоты имеет два максимума поглощения в УФ-области (233 нм с $E^{1\%}_{см} = 430$ и 275 нм). ИК-спектр характеризуется следующими основными полосами: 1710, 1738, 1275, 1110, 1037 $см^{-1}$.

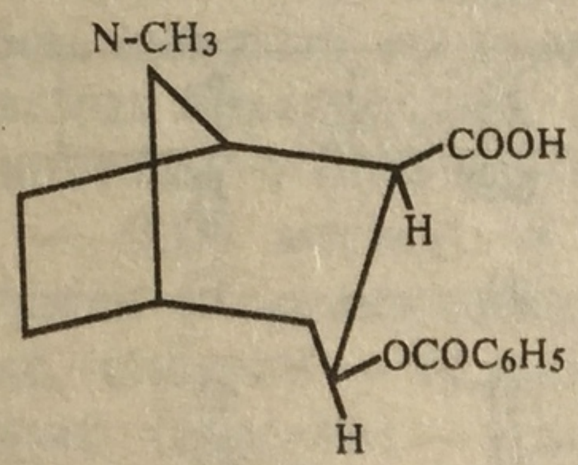
Фармакокинетика и метаболизм кокаина. Основные метаболиты кокаина — бензоилэкгонин, экгонин и метиловый эфир экгонина — неактивны; в небольших количествах образуется активный метаболит — норкокаин; из других метаболитов отмечены этилэкгонин, гидроксикокаин и метилэкгонин. От 1 до 9% ежедневной внутривенной дозы 120 мг кокаина выводится в неизмененном виде, от 35 до 55% — в виде бензоилэкгонина. Выведение кокаина в нативной форме увеличивается с уменьшением pH мочи. При начальном поступлении дозы 1,5 мг/кг свыше 4% выводится в неизмененном виде за 24 часа и от 16 до 34% дозы — в виде бензоилэкгонина. Объем распределения (V_d) кокаина — от 1 до 3 л/кг, клиренс — 10 — 30 мл/мин/кг и период полувыведения — 0,7 — 1,5 часа (формулы метаболитов приведены ниже). Кокаин продолжает активно метаболизировать в отобранной пробе мочи, поэтому в пробу для анализа рекомендуют добавлять консервант — фторид натрия.



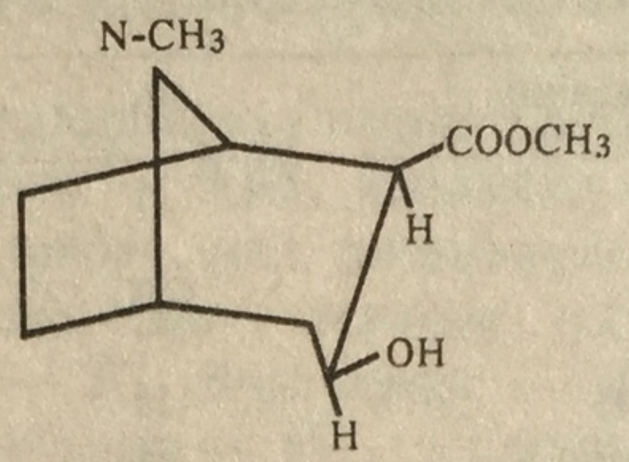
кокаин



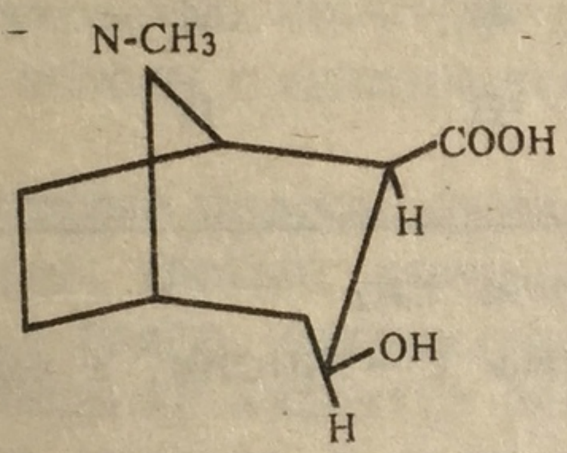
норкокаин



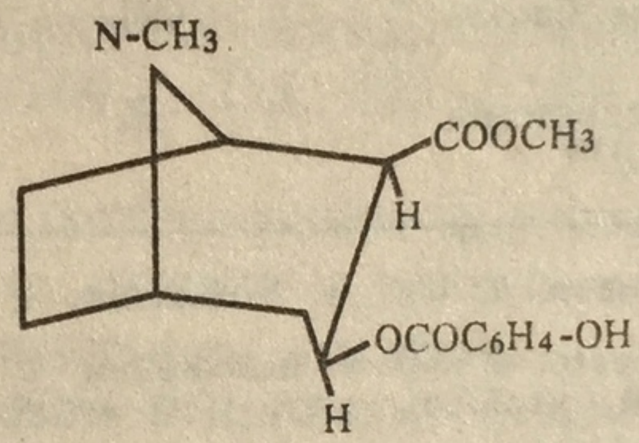
бензоилэкгонин



метилэкгонин



экгонин



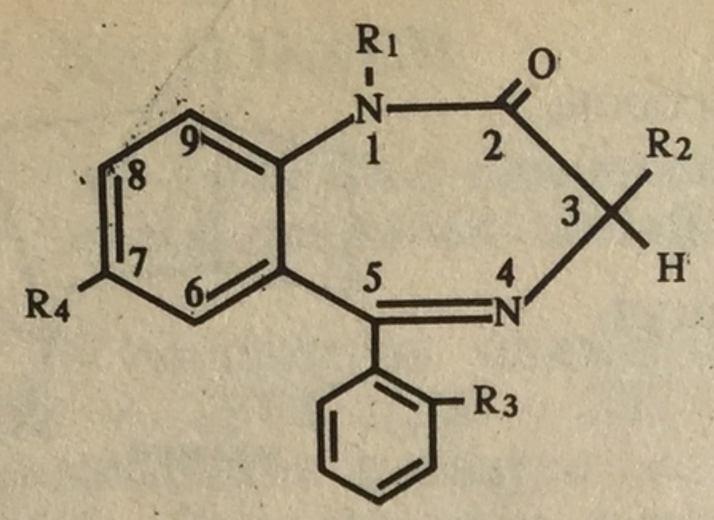
гидроксикокаин

3.6. ПРОИЗВОДНЫЕ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА

Из числа транквилизаторов бензодиазепины остаются непревзойденными по активности, спектру терапевтического действия и малой токсичности. Более того, с каждым годом перечень бензодиазепинов, обладающих физиологической активностью, непрерывно расширяется как в ряду производных 1,4-бензодиазепина, так и за счет синтеза и внедрения в клиническую практику производных 1,5- и 2,3-бензодиазепина.

В эту группу входит около 100 наименований импортных и отечественных препаратов и более 2000 фармакологически активных соединений данной структуры. Все более распространяющиеся факты злоупотребления соединениями данной группы послужили основанием для Комиссии ООН по наркотикам в 1984 г. отнести эту группу к соединениям, находящимся под международным контролем. Общая формула и структура некоторых наиболее распространенных бензодиазепинов и продуктов их гидролиза приведены в табл. 18 и 19.

Таблица 18. **Химическая структура некоторых бензодиазепинов**

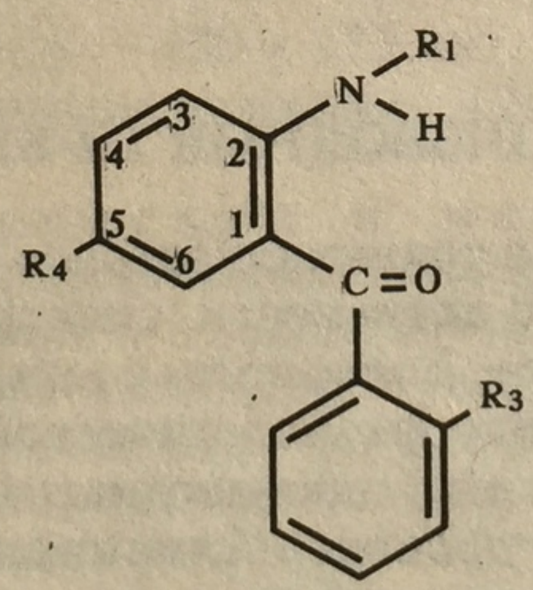


1,4-бензодиазепин	R_1	R_2	R_3	R_4
Оксазепам (нозепам)	H	OH	H	Cl
Диазепам (сибазон)	CH_3	H	H	Cl
Нитразепам	H	H	H	NO_2
Феназепам	H	H	Cl	Br
Гидазепам	$CH_2—C(O)—NH—NH_2$	H	H	Br
Медазепам (мезапам)*	CH_3	H	H	Cl
Хлордиазепоксид (хлозепид)**	H	H	H	Cl

* Вместо C = 0 в положении 2 стоит группа CH_2.

** Вместо C = 0 в положении 2 стоит группа C — NH(CH_3), в положении 4 стоит N 0, двойная связь N(1) = C(2).

Таблица 19. **Химическая структура некоторых бензофенонов**



Бензодиазепины	Продукт гидролиза — бензофенон	
	Наименование	Сокращение
Оксазепам	2-амино-5-хлорбензофенон	АХБ
Хлордиазепоксид	"	"
Диазепам	2-метиламино-5-хлорбензофенон	МБХ
Нитразепам	2-амино-5-нитробензофенон	АНБ
Феназепам	(2-амино,5-бром),2′-хлорбензофенон	АБХБ

3.6.1. Физико-химические свойства

Производные 1,4-бензодиазепина являются или слабыми основаниями, или амфолитами. Основность соединений данного типа увеличивается при введении в молекулу электронодонорных заместителей. Введение карбонильных, гидрокси- и карбоксильных групп в молекулу снижает основной характер соединений (значения pK_a хлозепида — 4,6; сибазона — 3,4; мезапама— 6,27; феназепама — 2,3 и 12,5; нитразепама — 3,2 и 10,5; лоразепама — 1,3 и 11,5). Второе значение pK_a определяется кислотным характером амидной группы.

Основания производных 1,4-бензодиазепина плохо растворяются в воде (нозепам — 0,03 мг/мл, сибазон — 0,05, хлозепид — 2, лоразепам — 0,08 мг/мл). В то же время они достаточно хорошо растворяются в органических растворителях: этаноле (нозепам — 4,3 мг/мл, сибазон — 41, хлозепид — 23, лоразепам — 14 мг/мл), хлороформе (нозепам — 3 мг/мл, сибазон — 500, хлозепид — 17, лоразепам — 3 мг/мл), несколько хуже в диэтиловом эфире.

В электронных спектрах производных 1,4-бензодиазепинов имеется три полосы с максимумами при 200 — 215, 220 — 240 и 290—330 нм.

Две первые полосы соответствуют возбуждению ароматических хромофоров, третью, длинноволновую, относят к поглощению азометиновой связи, сопряженной с бензольным кольцом.

Амфотерный характер бензодиазепинов приводит к изменению характера спектра в зависимости от величины pH раствора, в котором снимается спектр. В кислой среде изменение спектра относят за счет протонирования атомов азота в первом и четвертом положениях кольца, а в щелочной — за счет лактим-лактамной таутомерии азометинового фрагмента и увеличения цепи сопряжения хромофоров (табл. 20).

Таблица 20. **Максимумы поглощения 1,4-бензодиазепинов, их основных метаболитов и бензофенонов**

№ п/п	Соединения	$\lambda_{(макс)}$, нм		
		Этанол, (96°)	0,1 н HCl	0,1 н NaOH
1.	Хлозепид	245, 267	245, 310	261
2.	Демоксепам	235, 312	235	243, 257
3.	1,1′-диметилхлозепид	242, 263	246, 310	258
4.	2-амино-5-хлорбензофенон	232, 392	260	
5.	Сибазон	230, 255	241, 285, 360	229
6.	Нордиазепам	228, 325	232, 282, 370	340

7.	3-гидроксисибазон	231, 255, 315	235, 283, 355	
8.	Нозепам	229, 324	234, 281	234, 340
9.	2-метиламино-5-хлорбензофенон	236, 410	270	
10.	Нитразепам	220, 258, 312	280	226, 258, 357
11.	2-аминонитразепам	242, 350	232, 282, 350	238, 350
12.	2-ацетамидонитразепам	242, 330	257	237
13.	2-амино-5-нитробензофенон	230, 350	355	355
14.	2,5-диаминобензофенон	232, 363	232, 357	243, 400
15.	Мезапам	231, 252, 360	254	
16.	Лоразепам	229, 322	230	234, 349
17.	2-амино-5,2′-дихлорбензофенон	233, 266, 330, 394	232, 394	394
18.	2-амино-5-бром-2′-хлорбензофенон	232, 403		
19.	Феназепам	230	241	

Легкоинтерпретируемые ИК-спектры получаются при работе с растворами в четыреххлористом углероде. Однако низкая растворимость в нем многих бензодиазепинов не всегда позволяет получать такие спектры. Спектры кристаллических образцов 1,4-бензодиазепинов, как правило, сложнее вследствие межмолекулярных взаимодействий. В них достоверное отнесение можно сделать только для некоторых характеристических полос (табл. 21).

Таблица 21. **Основные характеристические частоты ИК-спектров 1,4-бензодиазепинов, см$^{-1}$**

Хлозепид	Диазепам	Нитразепам	Оксазепам	Тип колебаний, связь	
1700		1710	1706	N — H	(валентн.)
1625	1680	1685	1687	C = O	(валентн.)
1590			1578	N → O; NO_2	(валентн.)
1260		1255		$C_{ар}$ — H	(деформ.)
850	840		830	$C_{ар}$ — Cl	(деформ.)
760	740	748		$C_{ар}$ — H	(деформ.)
690	705		693	$C_{ар}$ — Cl	(валентн.)

Растворы 1,4-бензодиазепинов более стабильны в спирте, чем в воде. В кислых водных растворах, особенно при нагревании, 1,4-бензодиазепины гидролизуются с образованием производных аминобензофенона, имеющих желтую окраску. Особенно быстро

гидролизуются оксазепам и диазепам; напротив, феназепам и медазепам с трудом поддаются гидролизу. В присутствии очень малого количества воды (1%) в качестве продукта разложения может также получаться хинолон.

В биологических объектах стабильность 1,4-бензодиазепинов разная и существенно зависит от их структуры. Так, сибазон в плазме практически не разрушается в течение трех недель при комнатной температуре, восьми недель при 4°С и одного года при —20°С. Нитразепам в плазме стабилен как минимум три недели при 4°С (в темноте) и более трех недель в замороженном образце. При хранении внутренних органов трупа (печень, желудок, кишечник) и биологических жидкостей (моча), содержащих производные 1,4-бензодиазепина, при комнатной температуре последние подвергаются различным процессам биотрансформации и разложения. Так, нитразепам восстанавливается до 7-аминопроизводного, который в течение четырех недель разлагается до 2,5-диаминобензофенона. Параллельно с процессами восстановления идет гидролиз нитразепама до 2-амино-5-нитробензофенона. Достаточно быстро (в течение 1 — 8 недель) разрушается в трупном материале хлозепид. Основные реакции — окисление и гидролиз. В результате гидролитических процессов образуется 2-амино-5-хлорбензофенон, а реакций окисления — демоксепам; последний под влиянием микроорганизмов восстанавливается до нордиазепама.

3.6.2. Фармакокинетика и метаболизм 1,4-бензодиазепинов

Все бензодиазепины в общем хорошо всасываются из пищеварительного тракта, достигая максимального уровня в крови спустя 1 — 3 часа, однако наблюдаются и некоторые различия в их поведении в организме. Бензодиазепины активно связываются с белками крови, проявляют большое сродство к жировым тканям, в которых накапливаются и из них выделяются в кровь. Этим явлением в значительной степени обеспечивается достаточно длинный период их полувыведения (табл. 22).

Таблица 22. **Фармакокинетические параметры некоторых бензодиазепинов**

Вещество	pK_a	Период полувыведения, $T_{1/2}$ (ч)	Объем распределения, V_d, мг/кг веса	% связывания с белками плазмы
Хлозепид	4,6	8 — 28	0,3 — 0,5	94 — 97
Диазепам	3,3	20 — 96	0,7	98
Оксазепам	1,7	7 — 14	1,6	90
	11,6			
Нитразепам	3,2	21 — 28	2,1	85
Лоразепам	1,3	10 — 16		94
	11,5			
Клоназепам		10 — 40		82

Бензодиазепины выделяются прежде всего с мочой (свыше 60% дозы), остальная часть удаляется через пищеварительный тракт.

Производные бензодиазепинов подвергаются биотрансформации в печени, превращаясь в несколько метаболитов, проявляющих в свою очередь большую фармакологическую активность. Процессы биотрансформации — самые разнообразные и включают в себя реакции окисления, деметилирования, дезаминирования, гидроксилирования, ацетилирования, восстановления и конъюгации с глюкуроновой кислотой (схемы 12 — 16).

МЕТАБОЛИЗМ ДИАЗЕПАМА

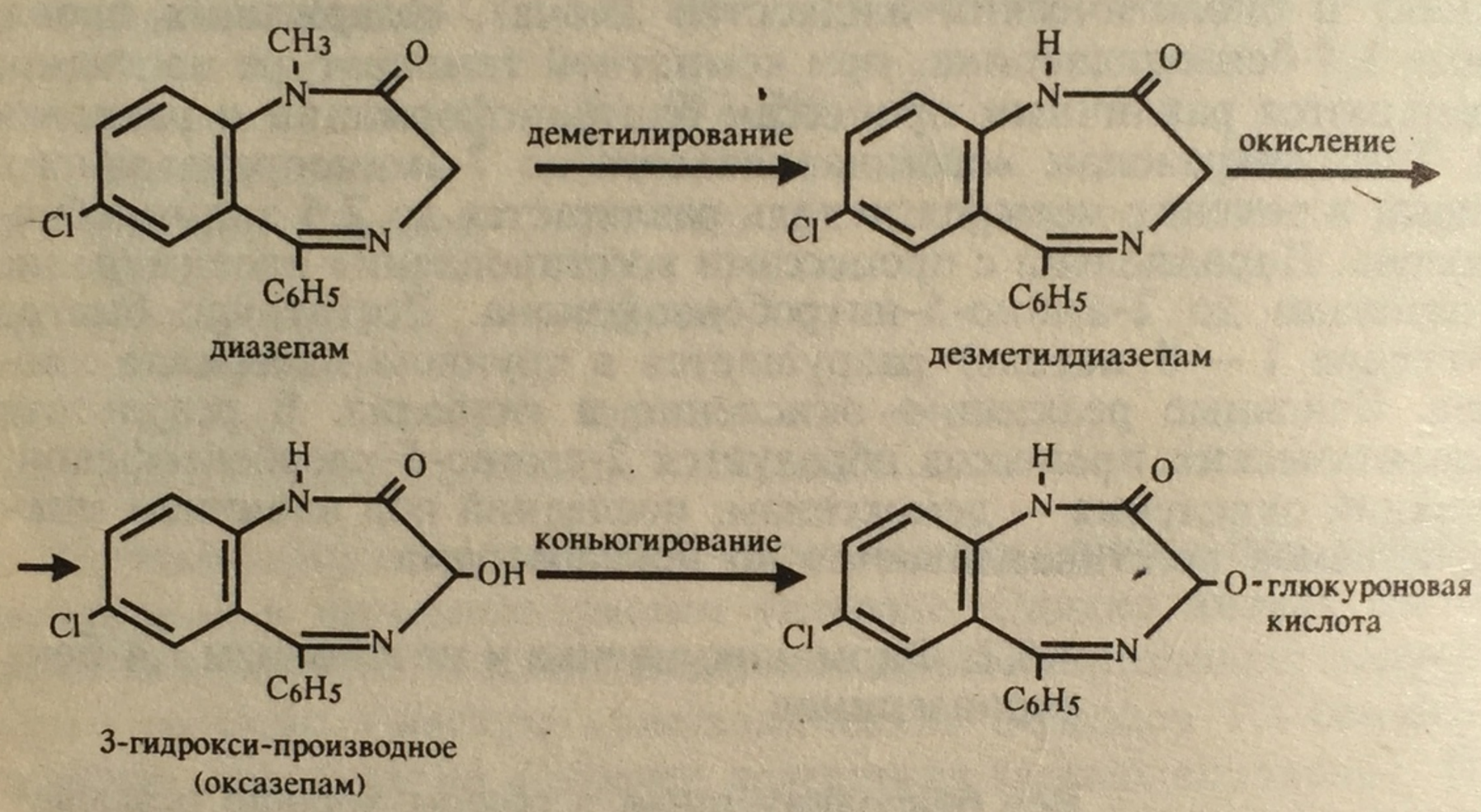


Схема 12

МЕТАБОЛИЗМ ХЛОЗЕПИДА

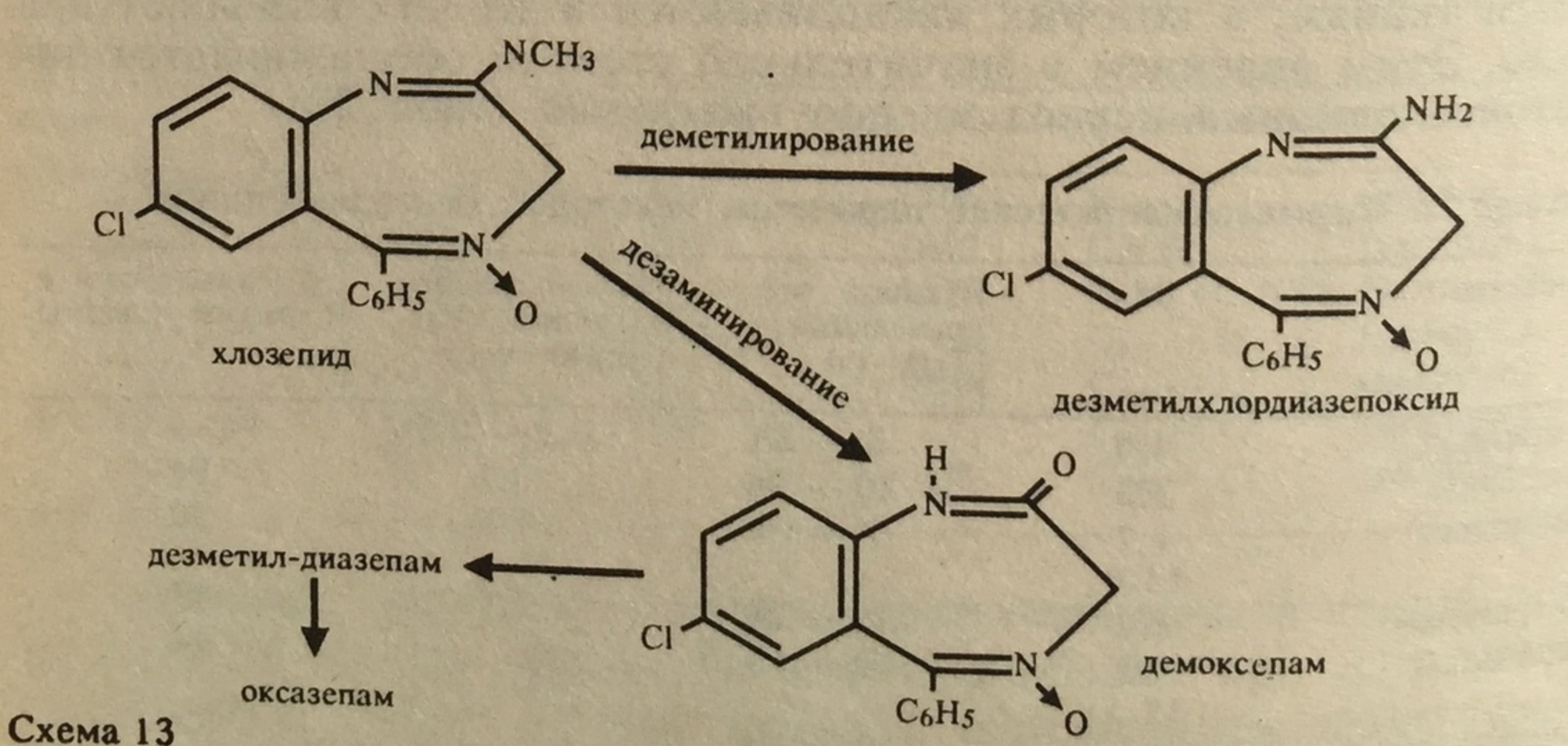


Схема 13

МЕТАБОЛИЗМ ОКСАЗЕПАМА

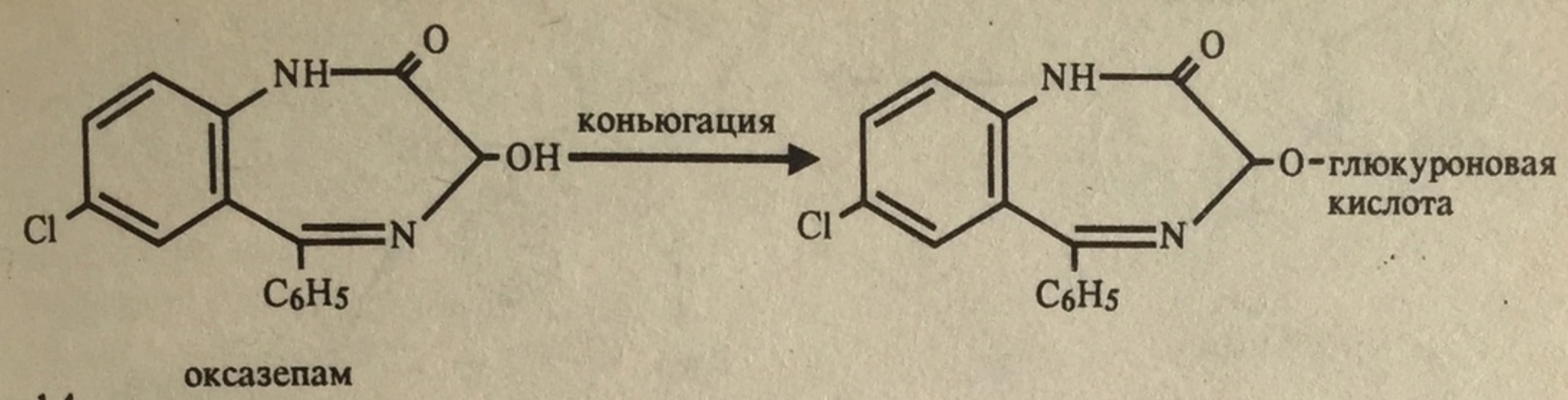


Схема 14

МЕТАБОЛИЗМ НИТРАЗЕПАМА

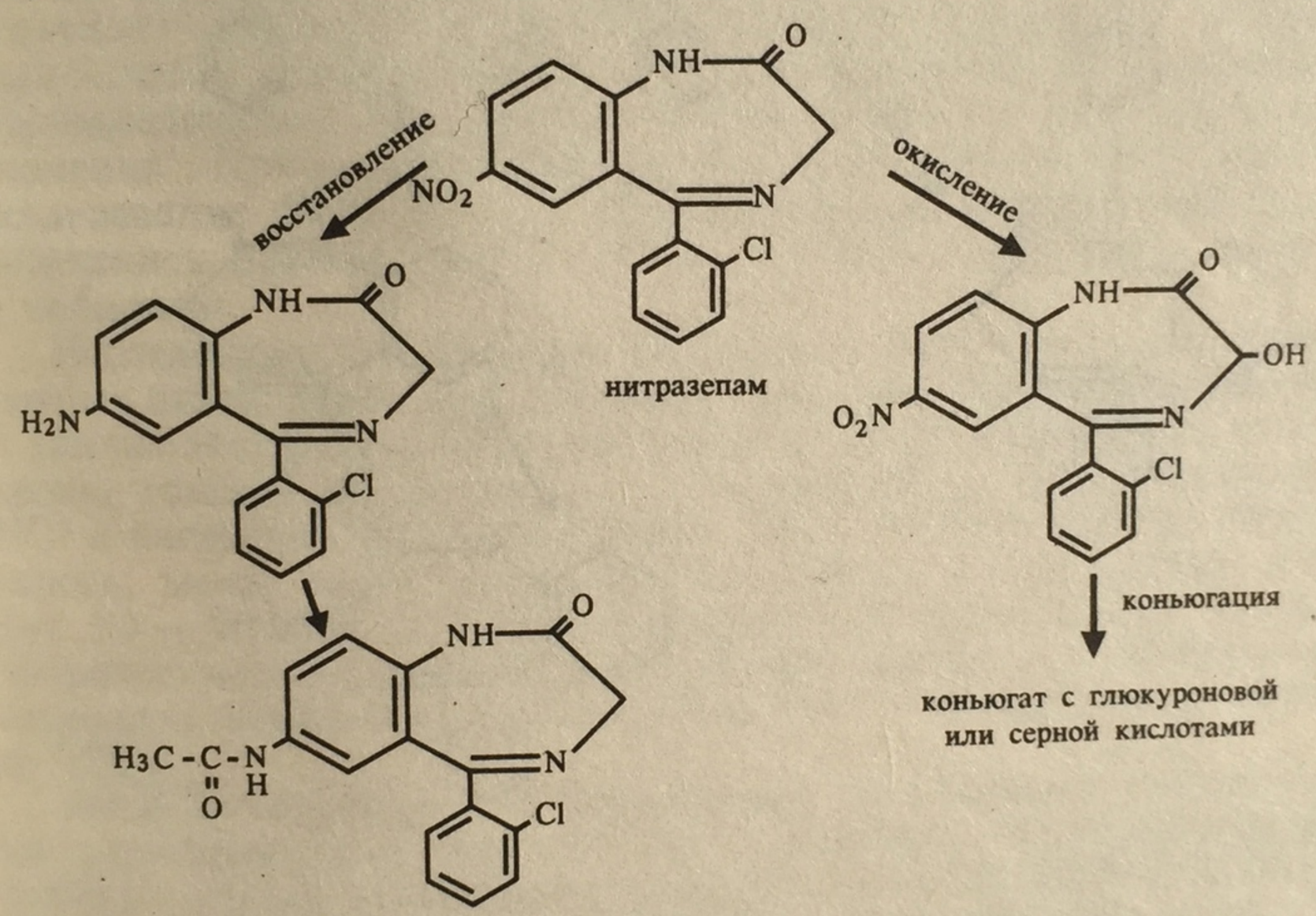


Схема 15

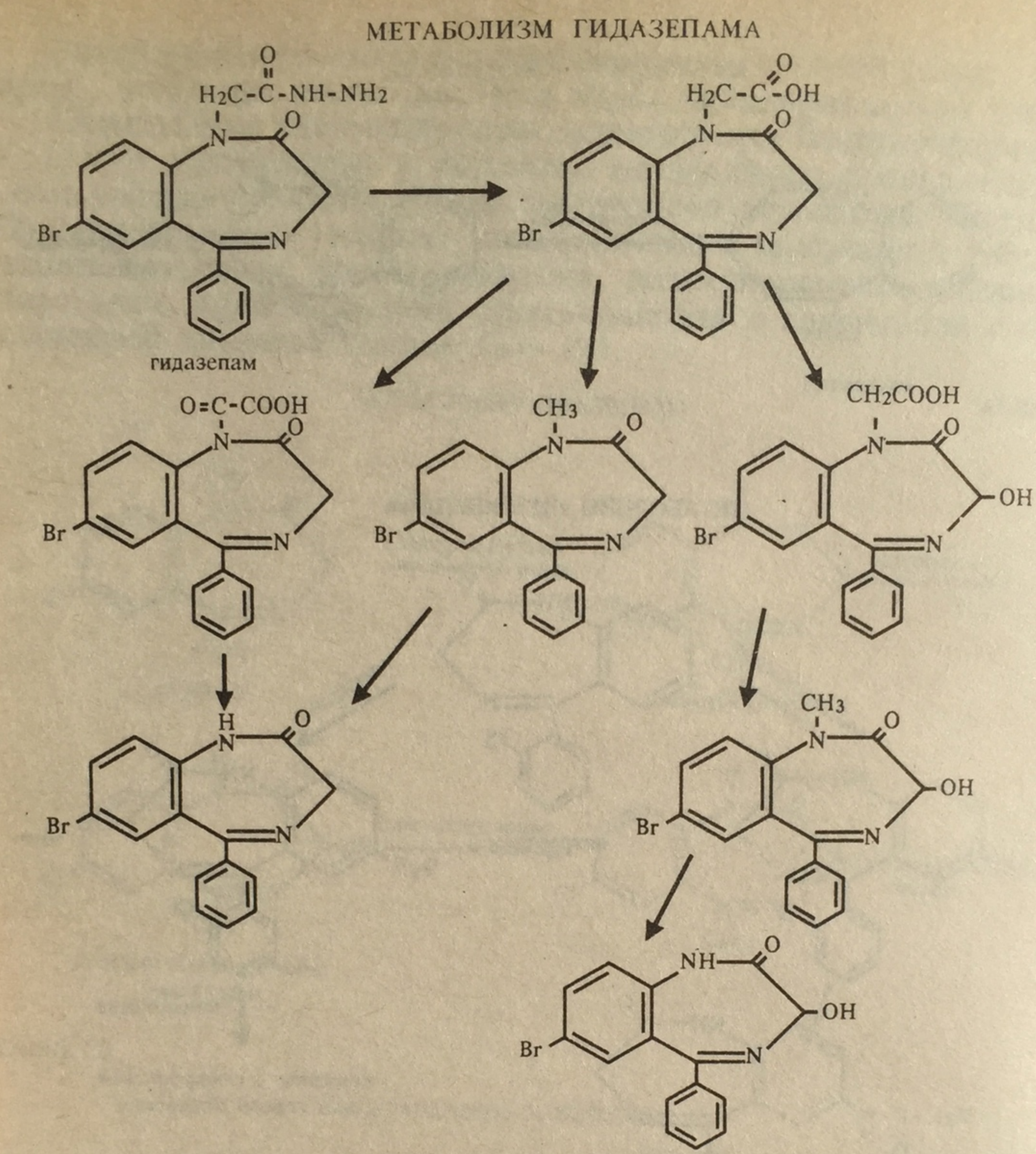


Схема 16

3.6.3. Анализ бензодиазепинов

В настоящее время можно выделить два основных направления в анализе объектов на 1,4-бензодиазепины: а) по продуктам гидролиза — аминобензофенонам; б) по нативным соединениям и метаболитам.

Первое направление предусматривает в основном кислотный гидролиз 1,4-бензодиазепинов и их метаболитов после предварительной экстракции, сорбции или в процессе деструкции ткани до соответствующих аминобензофенонов с последующим использованием для их идентификации сочетания хроматографических (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) и спектральных методов.

Второе, более сложное, включает изолирование нативных соединений и ряда гидрофобных метаболитов экстракцией подкисленной водой (органы и ткани) с последующим концентрированием экстракцией органическими растворителями или сорбцией. Для биологических жидкостей используется прямая экстракция органическими растворителями при pH=6 — 8 или сорбция на полисорбе-1.

Далее для обнаружения и определения бензодиазепинов и их метаболитов используется комплекс аналитических методов.

Первое направление применимо при определении хлозепида, нозепама, сибазона, феназепама, лоразепама, в меньшей степени нитразепама (при анализе лекарственных форм и на отдельных этапах исследования биологических объектов). Малоизученным остается данное направление по отношению к медазепаму.

Основное преимущество исследования 1,4-бензодиазепинов по производным аминобензофенона состоит в том, что данный способ позволяет суммарно определять нативное соединение и ряд его метаболитов. Отрицательному результату анализа гидролизованных бензодиазепинов придается "отрицательное судебно-химическое значение". При положительном результате необходимо продолжать исследование по нативным соединениям, что позволит более точно установить природу яда (особенно в случае хлозепида, нозепама и сибазона).

Исследование по аминобензофенонам включает в себя три основных этапа: кислотный гидролиз, экстракцию аминобензофенонов и анализ экстрактов. Объекты (остатки лекарственных форм, моча, кровь, гомогенаты органов или экстракты из них) заливают 6н HCl и нагревают при температуре 140 — 145°C в течение 60 минут (кровь, моча, части лекарственных форм, ткани печени, почек) или 80 — 90 минут (стенки желудка или кишечника). В случае направленного исследования на сибазон, нозепам, нитразепам время гидролиза можно сократить до 30 минут, а температуру уменьшить до 120°C.

Аминобензофеноны из гидролизатов экстрагируют органическими растворителями при pH=6 — 8. В случае исследования внутренних органов экстракцию проводят после предварительного отделения гидролизата (фильтрованием, центрифугированием). Экстрагенты — хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 100:1 (гидролизаты тканей и органов, остатков лекарственных форм) или гептан (гидролизаты крови и мочи).

Хроматография в тонких слоях (силикагель) используется в основном при исследовании внутренних органов трупа, мочи и лекарственных форм. Метод предусматривает не только разделение аминобензофенонов, но и их обнаружение по собственной окраске, флюоресценции в УФ-свете (2-метиламино-5-хлорбензофенон), образованию азокрасителя с N-α-нафтилэтилендиамином, β-нафтолом и т.п. Предел обнаружения составляет 1 — 5 мкг аминобензофенона в пятне.

Аминобензофеноны из зон, не обработанных реагентами, можно элюировать (спиртом или ацетоном) для снятия электронных спек-

тров и газохроматографического исследования. Основные полосы поглощения аминобензофенонов в этаноле можно наблюдать в области 230 — 240 и 390 — 410 нм.

При проведении исследования на 1,4-бензодиазепины по нативным соединениям объектами являются кровь, плазма, сыворотка, моча (не менее 10 мл), ткани печени, почек (не менее 200 г), желудок и тонкий кишечник с содержимым (не менее 200 г). Изъятые объекты по возможности быстро должны быть направлены на исследование в замороженном состоянии. Консервирование этанолом не рекомендуется. Анализ биологических объектов на 1,4-бензодиазепины желательно проводить незамедлительно.

Большинство 1,4-бензодиазепинов связывается с белками крови (в основном с альбумином), их терапевтические уровни могут быть определены современными методами ГЖХ и ВЭЖХ. Данные методы с успехом используются и при анализе мочи, иногда в сочетании с хроматографией в тонких слоях. Однако надо учитывать, что если кровь (плазма, сыворотка) является особенно ценным объектом для установления терапевтической, токсической или летальной концентрации 1,4-бензодиазепинов, то информация, полученная при хроматографическом исследовании мочи, позволяет более точно установить природу бензодиазепина. Соотношение концентраций "нативное соединение/метаболит" дает возможность установить длительность нахождения его в организме. Данные хроматографических (ТСХ) исследований производных 1,4-бензодиазепина приведены в табл. 22а.

Таблица 22а. **Значения R_f 1,4-бензодиазепинов в общей и частных системах**

Вещество	Общая система		Частная система		
	Хлороформ—ацетон (80:20)	Этилацетат	Хлороформ—метанол (90:10)	Этилацетат—метанол—аммиак (85:10:5)	Метанол
Хлозепид	0,62	0,00	0,50	0,10	0,51
Диазепам	0,75	0,23	0,73	0,58	0,77
Нитразепам	0,72	0,00	0,53	0,35	0,60
Оксазепам	0,56	0,00	0,40	0,22	

Обнаружение производных 1,4-бензодиазепина производят реагентами, дающими различные окраски:

а) реактив Драгендорфа в разбавленной уксусной кислоте образует оранжевые и желто-оранжевые комплексные соли;

б) реактив FPN (хлорид железа (III) в смеси хлорной и азотной кислот) окисляет бензодиазепины с образованием окрашенных продуктов желтого цвета;

в) реактив Марки образует окрашенные продукты желтого цвета;

г) подкисленный йодплатинат образует темноокрашенные пятна.

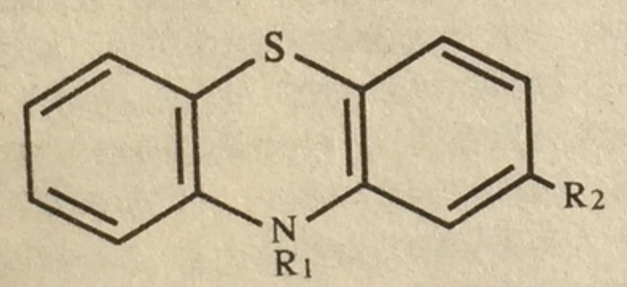
Для ГЖХ обнаружения производных 1,4-бензодиазепина и их метаболитов используется общая система: стеклянная колонка 2 м х 4 мм с 2,5% SE-30 на хромосорбе Q (80 — 100 меш). Хлозепид и его метаболиты имеют следующие индексы удерживания: хлозепид — 2453, демоксепам — 2529, дезметилдиазепам — 2496, оксазепам — 2336, диазепам — 2425, нитразепам — 2885, 7-ацетамидонитразепам — 3263, 7-аминонитразепам — 2900, 7-амино-3-гидроксинитразепам — 2890.

3.7. ПРОИЗВОДНЫЕ ФЕНОТИАЗИНА

Аминазин, дипразин, левомепромазин, тиоридазин являются наиболее часто встречающимися препаратами, на которые анализируются биологические объекты.

Данные соединения в виде оснований плохо растворяются в воде, хорошо — в этаноле, хлороформе, эфире. Высокая липофильность фенотиазинов обусловливает их депонирование в жировых тканях, вследствие чего они обладают большим периодом полувыведения, т.е. медленно выводятся из организма. Все фенотиазины относятся к веществам основного характера. Так, величина pK_a для аминазина — 9,3, дипразина — 9,1, тиоридазина — 9,5, левомепромазина — 9,3.

Растворы производных фенотиазина интенсивно поглощают в ультрафиолетовой области спектра. В их спектре отмечаются два максимума — 250 — 255 и 320 нм. Положение максимума определяется видом и положением заместителей в молекуле фенотиазина.



Метаболиты, особенно сульфоксиды, имеют более сложный спектр, например, в разбавленной кислоте спектр хлорпромазинсульфоксида характеризуется четырьмя максимумами — при 239, 274, 300 и 341 нм.

Основные характеристические частоты ИК-спектров, отражающие типы связей и функциональных групп фенотиазинов, сведены в табл. 23.

Таблица 23. **Основные характеристические частоты ИК-спектров, $см^{-1}$**

Аминазин	Дипразин	Левомепромазин	Тиоридазин	Типы колебаний и связь	
1561		1580		N—H	(деформацион.)
1240	1259, 1287	1270	1248, 1281	C—N	(валентные)
1220	1229	1205	1234	C—S	(валентные)
1095		1030		C—S	(деформацион.)
747	758	752	754	C—H	(деформацион.)

Производные фенотиазина являются химически очень лабильными соединениями, особенно легко окисляется атом серы, давая различные продукты сульфоокисления. Радикальные реакции окисления одинаково легко осуществляются как в растворах этих веществ в условиях окружающей среды, так и в живом организме.

Основные метаболитические реакции — это сульфоокисление, N-деметилирование, гидроксилирование, окисление, конъюгация с глюкуроновой кислотой.

Главным путем выведения фенотиазинов является моча. Методики определения производных фенотиазина в биологических жидкостях описаны в методических указаниях "Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание" (М.: МЗ СССР. 1989); более подробные сведения об анализе фенотиазинов можно найти в работах Е.М. Соломатина.

ГЛАВА 4

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБЫ К АНАЛИЗУ

На стадии пробоподготовки образец очищается от загрязнений, которые не следует отбрасывать, так как они могут быть источником дополнительной информации. Пробоподготовка — это стадия риска потерять анализируемое вещество и объект. Поэтому нелишне помнить о необходимости строгих и логически оправданных действий, направленных на сохранение образцов, отобранных для анализа, для дальнейшего исследования.

На стадии пробоотбора в анализе наркотических средств следует учитывать возможность уничтожения или фальсификации объекта; анализируемая проба может быть мала по массе, загрязнена и иметь химический состав, отличный от первоначального из-за воздействия окружающей среды при неправильном хранении.

При пробах небиологического происхождения (растительное сырье, порошки, таблетки, экстракты и проч.) навеска для анализа отбирается произвольно, если только она не оговорена методикой и не ограничена малым объемом образца. Самая маленькая проба должна быть проанализирована самыми чувствительными методами. Критерием выбора метода в этом случае является предел обнаружения вещества. Образцы небиологического происхождения, как правило, изымаются в процессе оперативно-следственных мероприятий и являются вещественными доказательствами.

Вид, количество биообразца, исследуемая аликвота в случае судебно-химического анализа, устанавливающего причины смерти, регламентируются соответствующими методическими письмами и рекомендациями.

Наиболее распространенным биологическим объектом для обнаружения в нем наркотических средств является моча. Выбор этого биообъекта для анализа обусловлен несколькими причинами. Во-первых, моча представляет собой один из самых информативных объектов, так как большинство наркотических веществ и их метаболиты выводятся из организма с мочой. Во-вторых, по существующим юридическим нормам процесс отбора биопробы не должен причинять обследуемому физического неудобства. Среди других биообъектов при анализе наркотических средств могут быть взяты на анализ кровь, слюна, волосы и др.

Процедура отбора пробы мочи должна обязательно проводиться *под наблюдением* персонала для предупреждения замены или порчи пробы. Необходимо учитывать, что проба может быть заменена образцом в заранее принесенном контейнере (грелка, склянка и т.д.), проба может быть испорчена добавлением воды, принесенного с собой уксуса, отбеливателей и других химических реагентов.

Объем отбираемой мочи должен быть не менее 250 мл. В случае меньшего количества биообразца в итоговом протоколе этот факт должен быть обязательно отмечен.

Сразу же после отбора пробы осуществляется *предварительный осмотр* ее с целью выяснения возможной фальсификации. В него входит: а) измерение температуры мочи; не позднее 5 минут после отбора температура отобранной биожидкости должна находиться в пределах 32,5 — 37,7°С; в случае значительного отклонения измеренной температуры отбор пробы повторяется с более тщательным наблюдением за процессом отбора; б) измерение pH мочи, которое должно находиться в пределах 5 — 7; в) визуальный осмотр (цвет, мутность) должен подтвердить естественность отобранной пробы.

Отобранная проба разливается в две ёмкости для хранения и транспортировки, для чего она маркируется, кодируется и опечатывается. Один из образцов анализируется на содержание наркотических средств, другой представляет собой образец для контрольного анализа.

При анализе мочи, точно так же как и других биологических объектов, на содержание одурманивающих веществ необходимо обращать внимание на потенциальные *фоновые* соединения как эндогенного, так и экзогенного характера, присутствие которых в анализируемом образце неизбежно при любом способе пробоподготовки.

Такими фоновыми эндогенными соединениями будут низкомолекулярные продукты метаболизма белков, аминокислот и сахаров (биогенные амины, мочевина, соли карбоновых кислот и др.), небольшие количества пептидов, сахаров, стероидов, пигмента уробилина и других веществ.

Среди разнообразных экзогенных фоновых соединений будут присутствовать продукты биотрансформации веществ, поступивших с пищей, и различных лекарственных веществ, используемых наркоманами для усиления наркотического эффекта, снятия синдрома абстиненции, смягчения "выхода" из состояния наркотического опьянения (барбитураты, производные 1,4-бензодиазепина), а также метаболиты других химических веществ, попавших в организм (красители, антиоксиданты, продукты табакокурения и т.д.).

Преданалитическая обработка мочи может состоять из различных операций: прямое концентрирование, экстракция растворителем, лиофилизация, хроматографическое разделение или сорбция на твердом сорбенте или комбинация различных операций (концентрирование — экстракция, лиофилизация — экстракция и др.).

Прямое концентрирование достигается упариванием некоторого количества мочи до небольшого объема на водяной бане либо роторном испарителе или лиофилизацией. Приемы концентрирования и очистки биообразца с использованием сорбции изложены в методических указаниях "Химико-токсикологический анализ наркотических и других одурманивающих веществ" (М.: МЗ СССР, 1987).

Жидкость-жидкостная экстракция как метод изолирования анализируемых соединений из мочи остается на сегодняшний день самым распространенным приемом выделения наркотических средств из биообъектов. В основе ее лежит распределение вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Количественно такое распределение можно охарактеризовать величинами коэффициента распределения (Кр) или логарифма отношения коэффициентов распределения (log P) вещества в различных органических растворителях, не смешивающихся с водой (см. Приложения), и величиной фактора извлечения (процент извлечения).

Фактор извлечения будет зависеть от химической природы экстрагируемого вещества, и в первую очередь от константы его ионизации (pKa) (см. Приложения), значения pH мочи при выполнении экстракции, селективности экстрагента и внешних условий процесса (температура, техника выполнения и т.д.).

ГЛАВА 5

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Большинство анализируемых биообъектов, содержащих токсические вещества, делятся на следующие категории в зависимости от их морфологических особенностей, определяющих соответствующие схемы пробоподготовки.

1. Жидкости с небольшим содержанием биологического материала — промывные воды желудка, вода, вино, пиво, спирты, минеральная вода.

2. Жидкости с заметным содержанием биологического материала — кровь, желудочный сок и содержимое кишечника, чай, кофе, молоко, сиропы, супы.

3. Твердые вещества, которые являются простыми соединениями или простыми смесями, — таблетки, капсулы, сахар, соль, остатки "неизвестного" порошка и т.д.

4. Твердые вещества, которые являются сложными смесями, — хлеб, жиры, масла и все виды живых тканей (мускулы, волосы, ногти, мозг, печень, почки), растительные ткани, цветы.

Каждая из этих групп требует своей аналитической схемы, так как методы изолирования, описанные для мочи (тип 1), не всегда пригодны для крови (тип 2) и тканей (тип 4), и наоборот (схемы 17 — 20). Методы изолирования, которые включают этап удаления белков, обычно необходимый для типа 4, совсем не обязательны для такого биоматериала с небольшим содержанием белка, как моча.

Правильные результаты анализа в целом и экстракции в частности во многом зависят от доинструментального этапа, т.е. преданалитической техники обработки образца. Для каждого биообъекта необходимо предусмотреть в связи с его спецификой следующее: 1) корректный отбор пробы; 2) хранение пробы; 3) подготовку пробы к экстракции; 4) схему и метод экстракции; 5) наличие эндогенных и экзогенных веществ, влияющих на чистоту экстракта и конечный анализ яда и его метаболитов.

Если первые четыре фактора связаны с техникой экстракционной обработки, учет последнего фактора требует от исследователя знания токсико- и фармакокинетических параметров биологической матрицы и анализируемого образца. На содержание эндогенных и экзогенных компонентов в экстракте влияют: 1) возраст, пол и вес пациента, определяющие во многом распределение яда и его метаболизм; 2) параллельное присутствие других экзогенных химических веществ (лекарственные средства, кофеин, табак, алкоголь и др.), изменяющих фармакокинетические и фармакодинамические

параметры яда; 3) диета — свободные жирные кислоты связываются с альбуминами и конкурируют на этапе связывания яда с белком: так, если токсическое вещество введено до приема пищи, то вследствие особенностей всасывания усиливается реабсорбция яда в тонкой кишке и соответственно повышается его концентрация в крови; 4) генетический эффект — относительно человека подобная информация очень разноречива, однако необходимо отметить, что отдельные индивидуумы обладают повышенной толерантностью к действию некоторых химических агентов; если для одних доза введенного яда является смертельной, то для других эта же доза относительно безвредна (по крайней мере не вызывает летального исхода); 5) другие факторы, действие которых необходимо предусматривать,— болезнь (может дать повышенный фон некоторых эндогенных соединений), работа с соединениями бытовой или индустриальной химии (повышенный фон эндо- и экзогенных веществ). Ниже приводятся некоторые особенности различных биообъектов.

Моча — наиболее распространенный объект исследования на лекарственные токсические соединения и наиболее простой биообъект (среди других) для анализа вследствие низкого содержания белковых компонентов.

Важным показателем мочи как биообъекта является pH, поэтому работа с ней требует постоянного внимания к изменению pH. Величина pH мочи повышается со временем из-за действия бактериальной флоры, выделяющей аммиак. Такое увеличение можно предотвратить путем ее хранения при пониженных температурах (при анализе очень лабильных веществ — в замороженном виде). Действие бактериальной флоры можно замедлить добавлением натрия фторида, борной кислоты и других бактериостатических препаратов, однако надо учитывать их дальнейшее участие в экстракции и образовании фона. Мочу можно лиофилизировать, предварительно переведя летучие соединения в соответствующие соли.

Из потенциальных эндогенных соединений необходимо отметить присутствие низкомолекулярных продуктов метаболизма аминокислот и сахаров (амины, мочевина, карбоновые кислоты и др.), небольших количеств пептидов и сахаров (в норме), стероидов и пигмента уробилина, окрашивающего мочу в желтый цвет (λ макс = 490 мм) и мешающего спектрофотометрическому определению.

Преданалитическая обработка мочи состоит из различных операций: прямого концентрирования, экстракции растворителем, хроматографического разделения или сорбции на твердом сорбенте. Как правило, изолирование из мочи проводят по схеме 17.

Кровь. Уровень токсических веществ и их метаболитов у живых объектов и в крови трупа неодинаков вследствие биохимических изменений. Содержание токсического вещества в артериальной или венозной крови также будет различным. Даже поло-

жение тела у живого пациента — стоя, сидя или лежа — влияет на биохимический состав пробы, так как в этом случае меняется содержание белков в крови, что особенно важно для токсических веществ, в значительной степени связывающихся с белком.

Жидкости с небольшим содержанием биологического материала
(моча, промывные воды желудка, вода, вино, пиво,
спирты, минеральная вода)

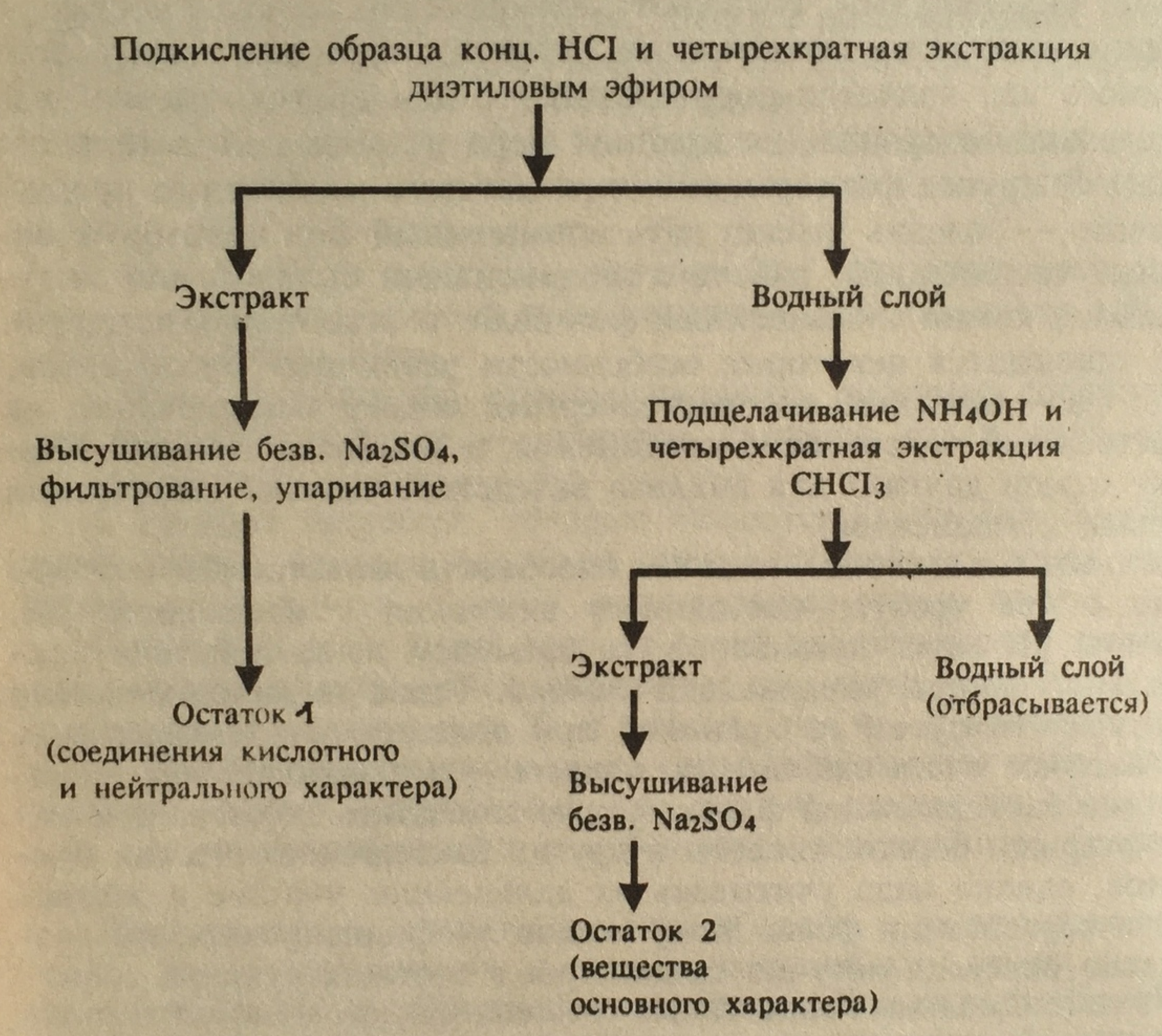


Схема 17

Обработке экстракцией может быть подвергнута цельная кровь, плазма или сыворотка. Если для предотвращения свертывания крови использовались антикоагулянты, то необходимо учитывать, что гепарин вытесняет жирные кислоты из мест их связывания с альбумином. Это влияет, с одной стороны, на увеличение связывания токсических веществ с белками, с другой — на переход жирных кислот в органический растворитель при экстракции. Для уменьшения энзиматической активности кровь рекомендуется хранить в холодильнике в замороженном виде.

Поскольку стеклянные стенки посуды содержат большое количество свободных гидроксильных групп, возможно связывание полярных токсических соединений стенками посуды за счет образования водородной связи. Это явление особенно важно учитывать

при анализе следовых количеств вещества. Предварительное силилирование стенок посуды позволяет свести это явление к минимуму. Альтернативой является использование посуды из полипропилена или тефлона, хотя при этом необходимо считаться с загрязнением пробы мономерами смолы.

Из других эндогенных соединений помимо жирных кислот в экстрактах из крови встречаются различные стероидные гормоны (тестостерон и др.), холестерин, которые в крови находятся в связанном состоянии с протеинами плазмы.

Слюна является продуктом секреции желез ротовой полости. Отобранную пробу слюны центрифугируют и для хранения замораживают, чтобы замедлить активность ферментов. Хранить лучше всего в склянках из тефлона или полипропилена, чтобы избежать поглощения следовых количеств анализируемого вещества стенками стеклянной посуды. Установлено, что неионизированные формы токсического вещества, находящиеся в водном растворе плазмы, пассивно диффундируют в слюну, так что существует прямая зависимость между концентрацией анализируемого вещества в слюне и его концентрацией в крови.

Волосы представляют собой относительно гомогенный (с точки зрения агрегатного состояния) биологический субстрат. Являясь легкодоступными для отбора, они представляют значительный интерес в качестве объекта при проведении химико-токсикологического анализа как на неорганические, так и на органические яды.

В последние годы установлено, что в волосах наркоманов обнаруживаются опиаты, амфетамины, фенциклидин, метаквалон, кокаин, каннабиноиды. Таким образом, возникает возможность обнаружения наркотиков в отдаленные сроки после окончания их приема и в тех случаях, когда анализ биожидкостей дает отрицательный результат. Важно, что наркотические вещества не метаболизируют в волосах.

Для отбора пробы на площади около 1 см^2 срезается прядка волос как можно ближе к основанию. При этом очень важно, чтобы волосы не изменяли своего относительного положения. Прядка фиксируется липкой лентой на бумаге, помечается верх и низ прядки. Принимая во внимание скорость роста волос (примерно 1 см в месяц), образец делится на кусочки различной длины и исследуется. При этом появляется возможность проследить динамику поступления наркотического вещества в организм пациента. Анализ волос длиной 6 — 8 см (6 — 8 месяцев) позволяет судить о степени тяжести наркотической зависимости.

Ногти содержат 10,1 — 13,7% воды и 0,15 — 0,76% жиро-подобных веществ (холестерин и его эфиры). Из органических веществ основным является белок кератин, устойчивый к воздействию различных химических веществ, а из минеральных веществ —

кальций, фосфор, цинк, мышьяк и др. В нашей стране факт накопления в ногтях наркотических соединений, и прежде всего опиатов, установлен недавно Е.А. Симоновым. Однако данных по определению наркотиков в ногтях еще недостаточно.

Ж е л ч ь является продуктом секреторной деятельности печени, желчного пузыря и двенадцатиперстной кишки. Эта жидкость содержит большое количество воды, эндогенных веществ, подобных тем, которые находятся в крови, плазме и сыворотке, а также желчные кислоты и пигменты. Желчь различается по величине pH (в пределах 6,7 — 8,3), что заставляет контролировать pH в ходе подготовки к экстракции, а при необходимости использовать подходящий буфер. Рекомендуется также пробу центрифугировать при низких скоростях (для удаления холестерина) и осадить белки добавлением смеси хлороформ — метанол (2:1) или хлороформ — изопропанол (9:2).

При экстракции из желчи желчные кислоты образуют стойкую эмульсию, поэтому для разделения фаз необходим длительный период центрифугирования; так как большинство токсических веществ выделяется из желчи в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой, желчь перед экстракцией подвергают гидролизу или обработке β-глюкуронидазой, а затем уже проводят экстракцию.

Экстракты из желчи часто окрашены, что затрудняет их спектрофотометрирование. Предварительное осаждение белков несколько осветляет пробы.

Вследствие липофильного характера большинства эндогенных веществ желчи экстракты обладают значительным фоном, особенно при использовании неполярных растворителей. Желчь экстрагируется по схеме 18.

Ф е к а л и и. Этот биообъект анализируется на содержание токсического вещества, которое экскретируется вместе с желчью, а также если известно, что оно не полностью абсорбировалось в желудочно-кишечном тракте после орального введения.

Для длительного хранения пробы замораживают или лиофилизируют, чтобы замедлить действие бактериальной флоры и уменьшить неприятный запах. Основная преданалитическая обработка состоит в гомогенизации пробы. Высушенные образцы, как правило, дают более воспроизводимые результаты. Экстракция проводится по схеме 18 или 20 при соответствующих значениях pH.

Основные эндогенные соединения — желчные кислоты, стероиды, сахара и порфирины. Вследствие присутствия в биообъекте большого количества экзогенных веществ, поступивших с пищей, результаты анализа отличаются большой вариабельностью.

П е ч е н ь представляет собой центральный орган химического гомеостаза. К основным функциям относятся обмен белков, углеводов, липидов, ферментов, витаминов, водный, минеральный и пигментный обмен, секреция желчи, детоксицирующая функция. Ее многообразные функции обусловливают присутствие самых разнообразных эндогенных и экзогенных соединений в экстракте. Это—

Жидкости с заметным содержанием биологического материала
(кровь, содержимое желудка, кишечника, чай, кофе, молоко, сиропы, супы)

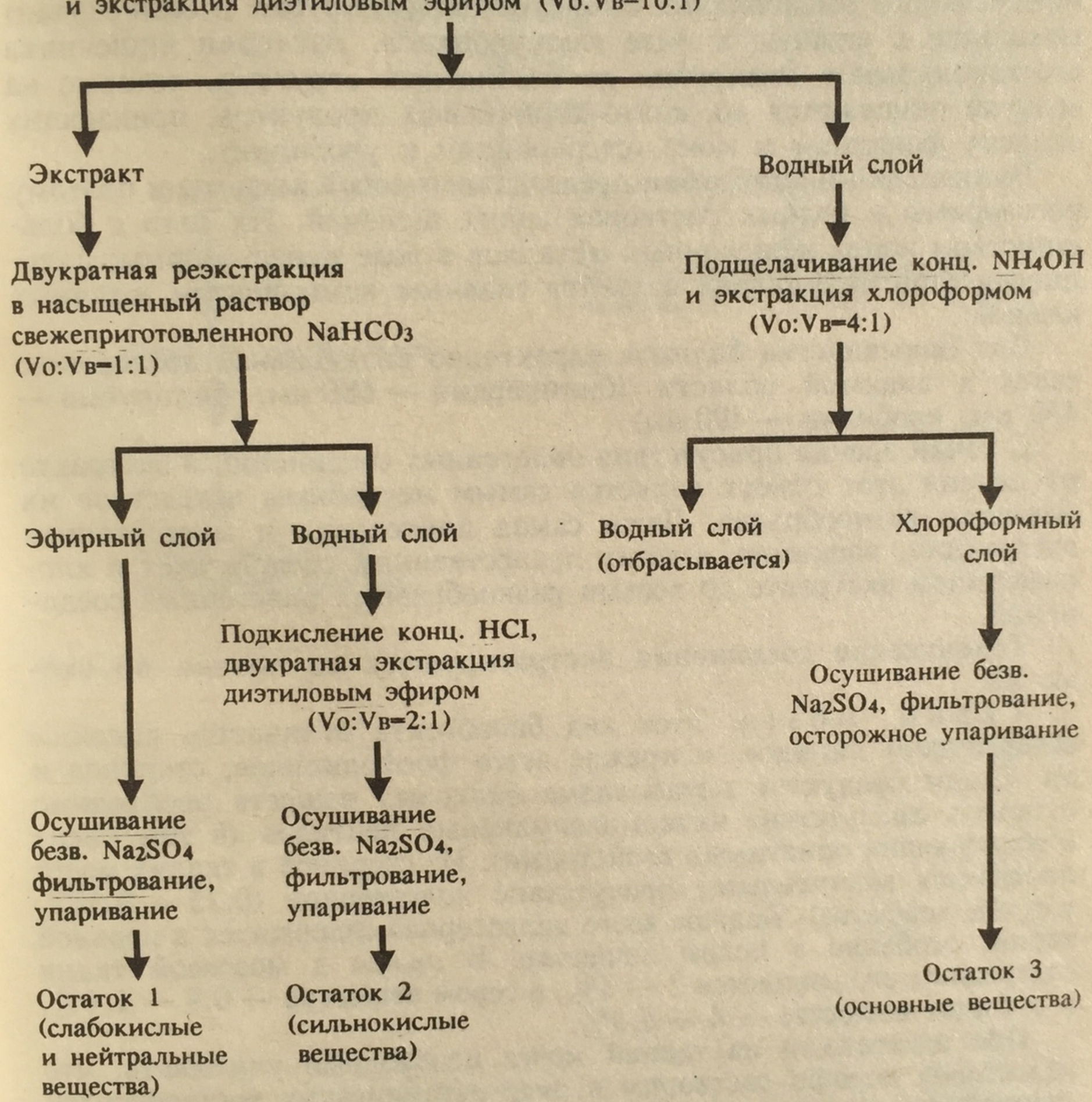


Схема 18

продукты белкового обмена (самый разнообразный белок и продукты его метаболизма вплоть до аммиака и мочевины), углеводного обмена (промежуточные продукты синтеза гликогена, окислительного фосфорилирования, реакций цикла Кребса), жирового обмена (метаболиты стероидов, полупродукты синтеза нейтральных, фосфо- и гликолипидов, холестерина и т.д.), продукты биотрансформации экзогенных, в том числе токсических, веществ, синтеза желчных

кислот (холевая, дезоксихолевая и другие желчные кислоты). Пигментный обмен приводит к образованию так называемых билинов — окрашенных веществ, которые вносят соответствующий фон и мешают спектрофотометрическому определению. Разрушение гемоглобина приводит к образованию открытых тетрапирролов, издавна известных как желчные пигменты: образованные в результате ферментативного расщепления билирубины (билирубин и биливердин) выводятся с желчью в виде глюкуронидов. Бактерии кишечника восстанавливают билирубин до бесцветных структур, которые на воздухе окисляются до желто-коричневых продуктов, придающих окраску фекалиям и моче (стеркобилин и уробилин).

Биливердин и билирубин представляют собой кислоты и поэтому растворимы в водных растворах едких щелочей. Их соли с большинством ионов нещелочных металлов в воде нерастворимы; кальциевая соль билирубина является главным компонентом желчных камней.

Для большинства билинов характерно интенсивное поглощение света в видимой области (биливердин — 680 нм, билирубин — 450 нм, уробилин — 490 нм).

С точки зрения присутствия эндогенных соединений в экстракте из печени этот объект является самым неудобным вследствие их большого разнообразия. Даже самая длительная и многоэтапная экстракция, например, кислых лекарственных средств дает в хлороформном экстракте до восьми разнообразных эндогенных соединений.

Токсические соединения экстрагируются из печени по схеме 20.

Ткани мозга. Этот вид биообъекта отличается высоким содержанием липидов, и прежде всего фосфолипидов, стеринов и др. Среди продуктов метаболизма белковых веществ необходимо отметить присутствие низкомолекулярных пептидов (в том числе и обладающих опиатными свойствами). Из стеринов в тканях мозга отмечается значительное присутствие холестерина (0,25 — 0,30% в сухом веществе). Больше всего холестерола содержится в нервной ткани, особенно в белом веществе. В целом в мозговой ткани содержание его равняется 2 — 3%, в сером веществе — 0,9 — 1,4%, а в белом веществе — 4 — 5,3%.

При экстракции из тканей мозга необходимо учитывать, что холестерол хорошо растворим в ряде органических растворителей (хлороформ, диэтиловый эфир, горячий этанол, бензол, сероуглерод, толуол, ацетон). В воде он нерастворим, но легко набухает, образуя стойкую эмульсию, вследствие чего может удерживать огромное количество воды, превышающее его массу в 100 раз. Поэтому становится очевидной необходимость предварительного (перед экстракцией) удаления липидов из пробы, что требует прежде всего разрушения комплекса "липид — жирорастворимое лекарство".

Ткани мозга экстрагируются по схеме 20.

Твердые вещества, являющиеся простыми соединениями или простыми смесями

(таблетки, капсулы, сахар, соли, остатки "неизвестного" порошка и т.д.)

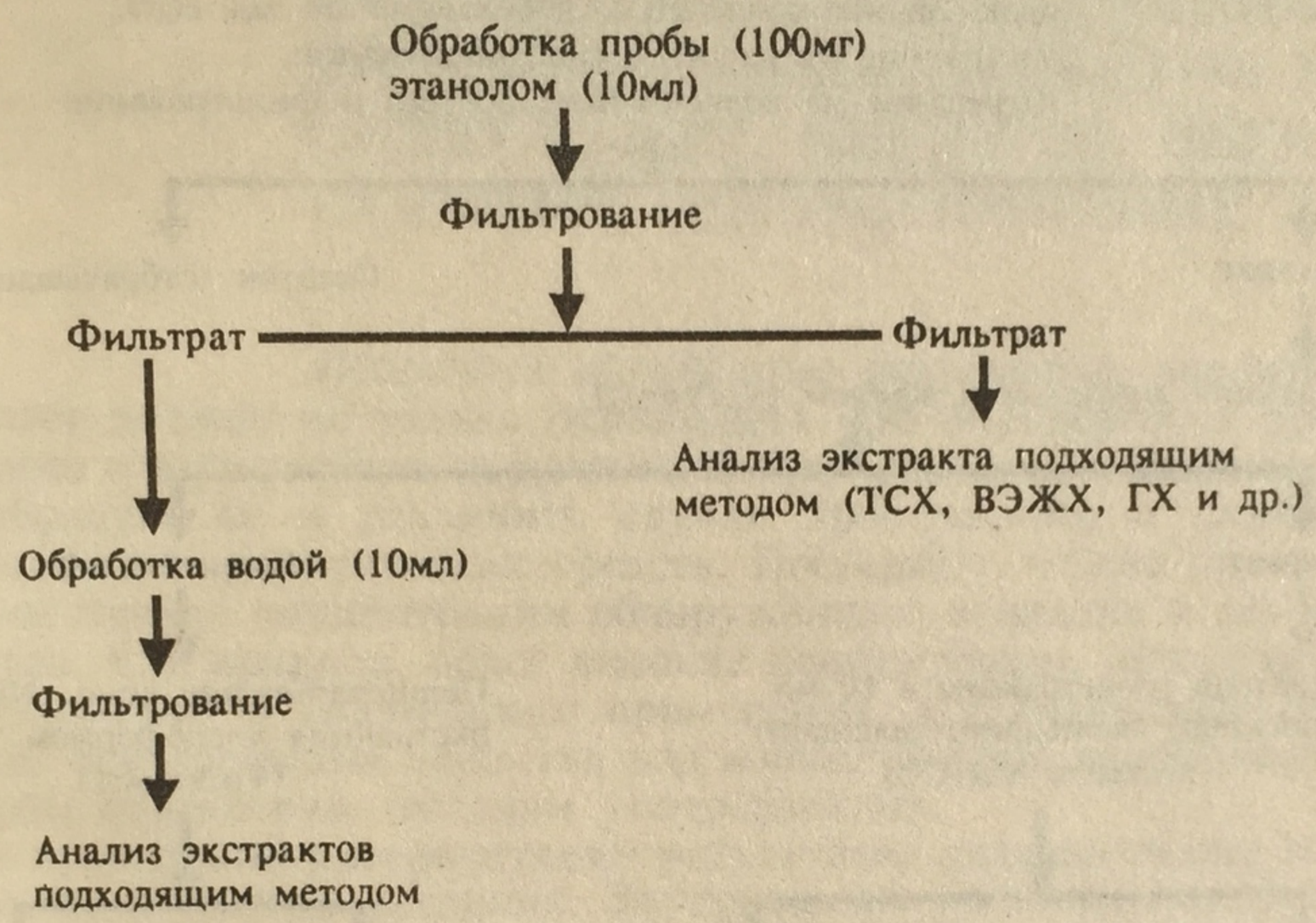


Схема 19

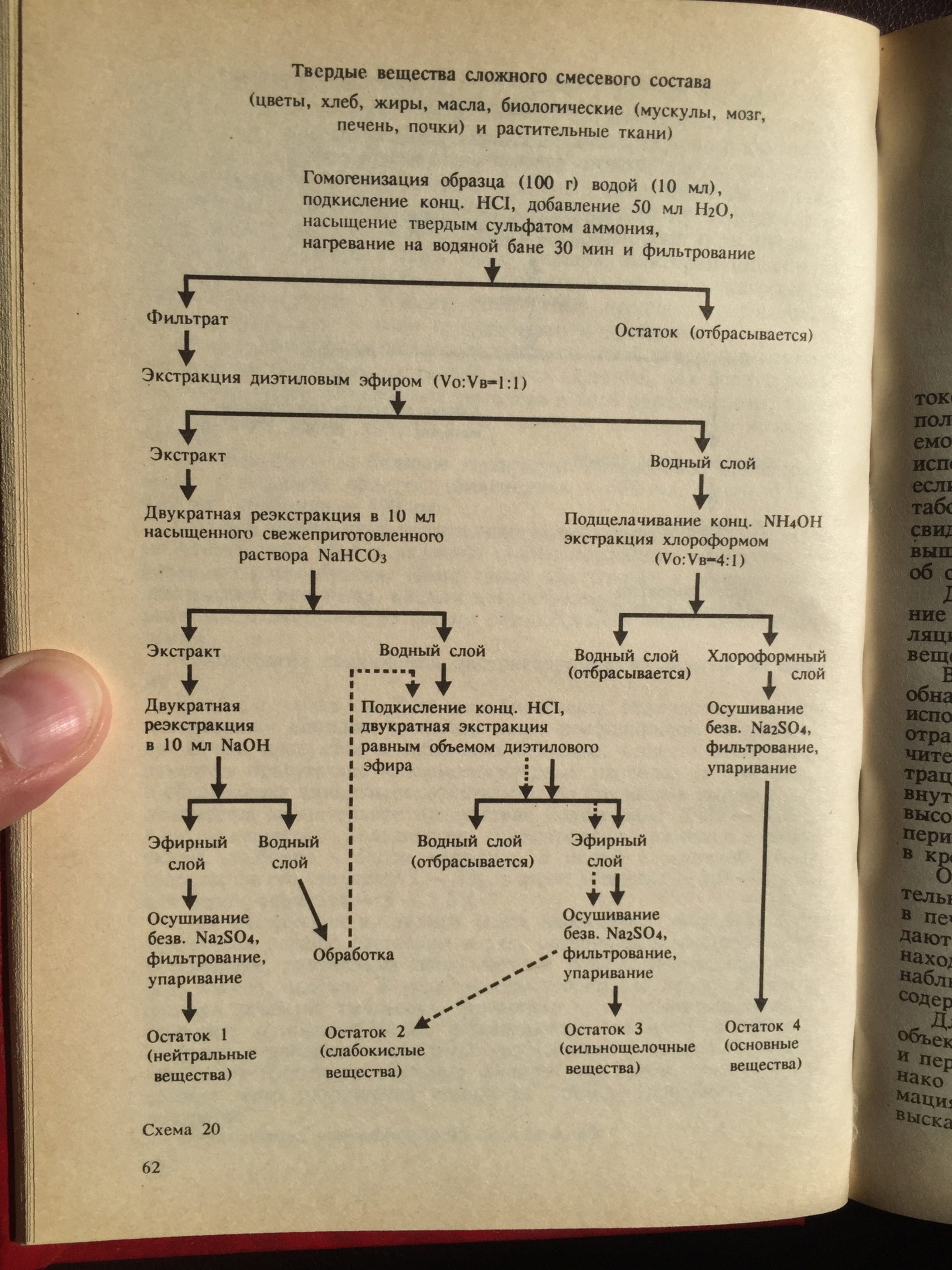

Твердые вещества сложного смесевого состава
(цветы, хлеб, жиры, масла, биологические (мускулы, мозг, печень, почки) и растительные ткани)
Гомогенизация образца (100 г) водой (10 мл), подкисление конц. HCl, добавление 50 мл H_2O, насыщение твердым сульфатом аммония, нагревание на водяной бане 30 мин и фильтрование
Фильтрат
Остаток (отбрасывается)
Экстракция диэтиловым эфиром (Vo:Vв=1:1)
Экстракт
Водный слой
Двукратная реэкстракция в 10 мл насыщенного свежеприготовленного раствора $NaHCO_3$
Подщелачивание конц. NH_4OH экстракция хлороформом (Vo:Vв=4:1)
Экстракт
Водный слой
Водный слой (отбрасывается)
Хлороформный слой
Двукратная реэкстракция в 10 мл NaOH
Подкисление конц. HCl, двукратная экстракция равным объемом диэтилового эфира
Осушивание безв. Na_2SO_4, фильтрование, упаривание
Эфирный слой
Водный слой
Водный слой (отбрасывается)
Эфирный слой
Осушивание безв. Na_2SO_4, фильтрование, упаривание
Обработка
Осушивание безв. Na_2SO_4, фильтрование, упаривание
Остаток 1 (нейтральные вещества)
Остаток 2 (слабокислые вещества)
Остаток 3 (сильнощелочные вещества)
Остаток 4 (основные вещества)

Схема 20

ГЛАВА 6

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

Используя полученные результаты, аналитик-токсиколог должен не только подтвердить или опровергнуть предположение о присутствии одурманивающего средства в анализируемом образце, но и различить случаи хронического и разового использования наркотических средств. Последнего можно достичь, если сопоставить концентрации обнаруженного вещества и его метаболитов. Как правило, более высокие концентрации метаболитов свидетельствуют о хроническом применении, а значительное превышение концентрации вещества над концентрацией метаболита— об остром отравлении (разовом употреблении).

Для правильной интерпретации результатов анализа важно знание формы и способа введения. Внутривенное введение или ингаляция в начальный момент дают более высокие концентрации вещества в крови, чем внутримышечное, оральное, подкожное.

В случае анализа трупного материала равные концентрации, обнаруженные в печени и крови, свидетельствуют о хроническом использовании высоких доз наркотических веществ. В случае острого отравления концентрация анализируемого вещества в печени значительно превышает концентрацию его в крови. Высокие концентрации одурманивающих средств в крови на раннем этапе после внутривенного или орального введения будут соответствовать более высоким концентрациям в легких и печени, в то время как в период выведения концентрация в желчи и моче будет выше, чем в крови.

Одурманивающие средства основного характера дают сравнительно низкие концентрации в крови, а отношение концентраций в печени и крови часто выше 10. Соединения кислого характера дают умеренно высокие концентрации в крови, и это отношение находится в пределах от 2 до 5. Для веществ нейтрального характера наблюдаются высокие концентрации в крови и почти одинаковое содержание в других тканях.

Для корректной интерпретации полученных данных такого биообъекта, как моча, необходимо также знание дозы, времени, способа и периодичности введения вещества, кинетики распределения. Однако надо оговориться, что в случае наркотиков подобная информация редко доступна и не всегда полна. Тем не менее можно высказать следующие замечания:

1. Чем выше введенная доза, тем больше вероятность их обнаружения. Высокие дозы обычно дают более высокие концентрации в плазме и моче. Так, например, при использовании 30 мг кодеина он может быть детектирован в моче в течение 1 — 6 часов после употребления, а при дозе в 60 мг — в течение 1 — 10 часов.

2. Концентрация вещества в плазме зависит от его распределения в организме, метаболизма и выведения. Для каждого вещества его фармакокинетика индивидуальна. Концентрация наркотических веществ в моче варьирует по сравнению с плазмой и зависит от объема и pH мочи.

3. Каждое вещество сохраняется в организме разное время. Такое вещество, как кокаин, элиминируется из организма относительно быстро. Например, обычная доза кокаина может быть детектирована в течение дня и менее. Ежедневное длительное употребление кокаина позволяет его обнаруживать в течение двух-трех дней после окончания употребления.

При курении одной сигареты гашиша в день в моче детектируются каннабиноиды в течение одного-двух дней после последнего употребления и в течение трех — пяти дней более чувствительными методами. Ежедневное курение позволяет обнаруживать каннабиноиды в течение трех и более недель после прекращения употребления.

Общим правилом является факт, что хроническое употребление гашиша приводит к аккумуляции веществ и их метаболитов в организме. Чем чаще прием, тем больше вероятность их обнаружения.

4. Различные вещества сохраняются в организме по-разному в зависимости от их химического строения и частоты употребления. Вещества, подобные кокаину, быстро выводятся из организма, поэтому отбор пробы мочи должен производиться как можно скорее после приема наркотика. Для веществ, которые медленно выводятся из организма (например, компоненты гашиша), время отбора мочи не имеет решающего значения.

Поскольку концентрация большинства веществ в моче (за исключением этанола) не коррелирует с их концентрацией в крови и степенью наркотического воздействия, время употребления наркотического вещества по концентрации в моче не может быть установлено.

ГЛАВА 7

ЭКСПРЕССНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ

7.1. АНАЛИЗ ПРОБ, НЕ ТРЕБУЮЩИХ СПЕЦИАЛЬНОЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Изъятые вещественные доказательства тщательно визуально осматриваются. Если образцы в разных упаковках отличаются чем-либо друг от друга (цвет, степень измельчения и т.д.), они отделяются от общей основной массы и анализируются отдельно. В случае если образцы однородны по своему состоянию, поступают следующим образом.

При количествах менее 10 упаковок анализируется содержимое всех образцов; от 10 до 100 — произвольно выбирается 10; при 100 — произвольно выбирается количество упаковок, равное корню квадратному из общего количества.

Качество образца, его агрегатное состояние, так же как и концентрация физиологически активных веществ в нем, различаются очень широко — от образца 100%-ной чистоты до очень разбавленных (наркотики кустарного приготовления, "уличные" концентрации). Кроме того, присутствие красителей, используемых для камуфляжа наркотика или окрашенных сопутствующих веществ из растительного сырья, может сказываться на ходе реакции и оценке конечного результата. На качество результатов могут также повлиять и различные комбинации, "коктейли" одурманивающих средств, используемых на наркорынке.

Чтобы достигнуть максимальной отдачи от предварительных тестов, необходимо соблюдать следующие правила:

1. Если количество образца очень мало для оценки экспресс-методом, его необходимо анализировать в стационарных лабораториях.

2. Из порошкообразных образцов необходимо протестировать несколько крупинок. Если надо повторить анализ, количество образца увеличивают приблизительно до размеров спичечной головки.

3. От таблеток, других твердых и резиноподобных образцов (например, гашиш, опий) берется небольшой кусочек, измельчается в порошок и анализируется.

4. Из капсулированных образцов вскрывается одна капсула и несколько крупинок содержимого анализируются (тестируются).

5. Из растительного сырья отбирается небольшое количество, измельчается и затем тестируется.

6. При анализе сигарет открывается одна сигарета, содержимое перемешивается, берется небольшое количество содержимого, измельчается и затем тестируется.

7. Если растительное сырье дает отрицательный ответ по результатам тестового анализа, но в отношении его имеются подозрения, что оно обработано каким-либо химическим веществом, лекарственным препаратом или их комбинацией, то образец его целиком должен быть доставлен в стационарную лабораторию для проведения более тщательного анализа.

7.2. ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА

Экспресс-тест образцов, подвергаемых контролю, может быть проведен различными способами. Наиболее распространенный — это использование стеклянных или фарфоровых пластинок с углублением, куда помещается образец, который затем обрабатывается реагентом (рис. 3).

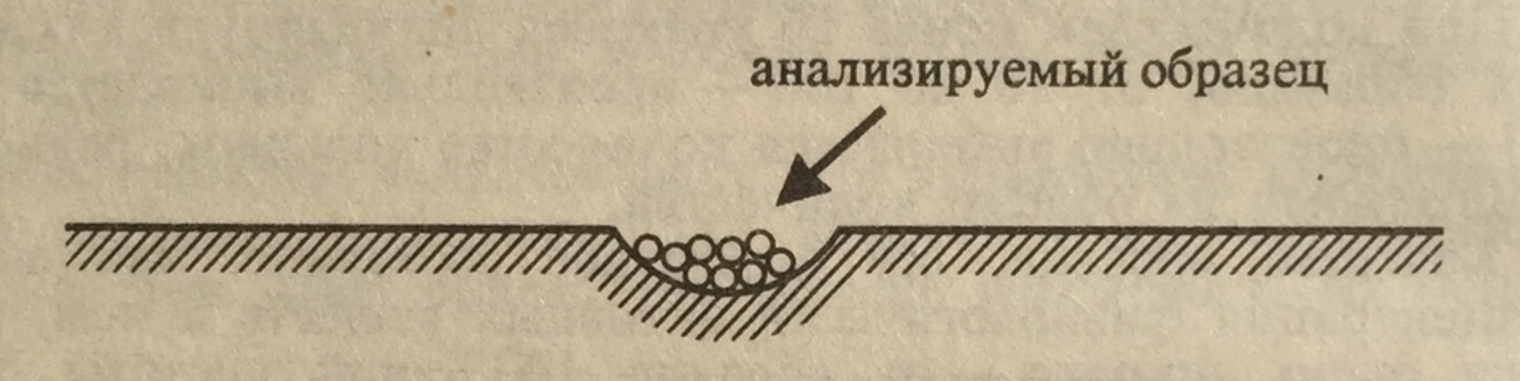


Рис. 3. Аналитическая пластинка для экспресс-тест-анализа

Эта пластинка должна быть промыта водой и органическим растворителем (ацетоном или метанолом) после каждого анализа.

Другая техника экспресс-теста предусматривает использование открытых тест-пробирок, куда помещается образец и обрабатывается согласно методике.

Кроме того, экспресс-тесты можно проводить на фильтровальной бумаге, на специальных пластинках (стрипах) или в заранее измеренных и упакованных тест-ампулах.

7.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следующие рекомендации можно высказать по интерпретации результатов по экспресс-тестам:

1. *Появление окраски* в результате теста дает возможность говорить лишь о положительном ответе, а в некоторых случаях эта окраска свидетельствует только о *возможном* присутствии вещества.

2. Во всех случаях, когда наблюдаются положительные или сомнительные результаты, образец должен быть проанализирован в стационарной лаборатории более тщательно.

3. В случае получения отрицательного или сомнительного результата можно повторить экспресс-тест с тем же самым образцом. Если и второй тест дает *отрицательный результат*, это должно означать, что образец *может не содержать* подозреваемого вещества. Однако, если есть причины для более тщательного анализа (по обстоятельствам дела), образец должен быть проанализирован в стационарных условиях. Затем анализируются показания экспресс-теста, результаты лабораторного исследования и причины, вызванные более строгим контролем.

Все экспресс-тесты имеют характер предположительного доказательства и не могут быть интерпретированы в качестве окончательных и безусловных заключений.

7.4. ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП

7.4.1. Опиум

А. Обнаружение с помощью реактива Марки

Реактивы: A_1 — 8 — 10 капель 40%-ного формальдегида в 10 мл уксусной кислоты; A_2 — концентрированная серная кислота.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластину.
2. Добавить три капли воды. Стеклянной палочкой или лопаточкой тщательно перемешать смесь на пластинке.
3. Перенести каплю жидкости в другое углубление пластинки.
4. Добавить одну каплю реагента A_1.
5. Добавить три капли реагента A_2.

Окраска от пурпурной до фиолетовой показывает на *возможное присутствие* опиума. Если в результате теста наблюдается коричневая окраска водного экстракта, необходимо повторить тест с небольшим количеством анализируемого образца.

Б. Обнаружение с помощью сульфата железа (III)

Реактивы: 5%-ный раствор сульфата железа (III) в воде.

1. Поместить небольшое количество образца на пластинку.
2. Добавить три капли воды. Стеклянной палочкой или лопаточкой тщательно перемешать смесь на пластинке.
3. Перенести каплю жидкости в другое углубление пластинки.
4. Добавить одну каплю реагента.

Пурпурно-коричневая окраска показывает на *возможное присутствие* опиума. При появлении коричневой окраски у водного раствора в результате теста повторить опыт с небольшим количеством анализируемого образца.

7.4.2. Морфин, кодеин, героин

А. Обнаружение с помощью реактива Марки

Реактивы: A_1 и A_2 (см.: Опиум).

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить одну каплю реагента A_1.
3. Добавить три капли реагента A_2.

Окраска от фиолетовой до красновато-пурпурной указывает на возможное присутствие морфина, или кодеина, или героина.

Б. Обнаружение с помощью реактива Мекке (тест проводится только в лабораторных условиях)

Реактивы: растворяют 1 г селеновой кислоты в 100 мл концентрированной серной кислоты.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить одну каплю реагента.
3. Добавить три капли концентрированной серной кислоты.

Окраска от голубой до зеленой показывает на возможное присутствие морфина, или кодеина, или героина.

Сходную окраску могут давать и другие контролируемые и неконтролируемые средства.

В. Обнаружение с помощью концентрированной азотной кислоты (тест проводится только в лабораторных условиях)

Реактивы: концентрированная HNO_3.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить одну каплю реагента.

Желтая окраска, медленно переходящая в светло-зеленую, указывает на возможное присутствие героина.

Оранжевая окраска, быстро переходящая в красную и затем медленно в желтую, указывает на возможное присутствие морфина.

Оранжевая окраска, медленно изменяющаяся до желтой, показывает возможное присутствие кодеина.

Сходные или другие окраски могут наблюдаться в присутствии других контролируемых и неконтролируемых веществ.

Этот реагент используется для дифференциации морфина, кодеина и героина. Этот тест не должен быть единственным, чаще всего его используют после тест-экспресса А.

Г. Обнаружение с помощью сульфата железа (III)

Реактивы: раствор 5 г сульфата железа (III) в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить две капли реагента.

Красная окраска показывает на возможное присутствие *морфина.*

7.4.3. Метадон

А. Обнаружение с помощью реактива Марки

Реактивы: A_1 — 8 — 10 капель 40%-ного раствора формальдегида в 10 мл ледяной уксусной кислоты; A_2 — концентрированная серная кислота (H_2SO_4, $\rho = 1{,}84$).

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить одну каплю реактива A_1.
3. Добавить три капли реактива A_2.

Чернильная окраска, медленно развивающаяся и изменяющаяся до фиолетовой, показывает на возможное присутствие метадона.

Сходную или другую окраску могут давать другие вещества, как находящиеся под контролем, так и неконтролируемые.

Б. Обнаружение с помощью смеси азотной и серной кислот

Реактивы: 10 капель концентрированной азотной кислоты растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластину.
2. Добавить две капли реагента.

Оранжевая окраска, медленно развивающаяся и переходящая в красную, показывает возможное присутствие метадона.

7.4.4. Амфетамин/метамфетамин и другие производные амфетамина

А. Обнаружение с помощью реактива Марки

Реактивы: A_1 — 10 капель 40%-ного раствора формальдегида в 10 мл ледяной уксусной кислоты; A_2 — концентрированная серная кислота.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить одну каплю реагента A_1.

3. Добавить две капли реагента A_2.

Оранжевая окраска, изменяющаяся до коричневой, указывает на возможное присутствие амфетамина.

Желтовато-зеленая окраска указывает на возможное присутствие метамфетамина (первитина).

Другие производные амфетамина также дают желтую, желтовато-зеленую и другие окраски.

Б. Обнаружение с помощью концентрированной серной кислоты (тест проводится в лабораторных условиях)

Реактивы: концентрированная серная кислота.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить две капли реагента.

В присутствии амфетамина и метамфетамина (первитина) окраска *не образуется.*

Этот реактив полезно использовать для дифференциации амфетамина, метамфетамина и других производных; если амфетамин и метамфетамин не образуют окраски с этим реактивом, то многие другие производные амфетамина образуют различные окраски.

В. Обнаружение с помощью реактива Симона

Реактивы: B_1 — смешивают равные объемы 10%-ного раствора ацетальдегида и 1%-ный раствор нитропруссида натрия; B_2 — растворяют 2 г карбоната натрия в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить одну каплю реагента B_1.

3. Добавить две капли реагента B_2.

Голубое окрашивание указывает на возможное присутствие метамфетамина (первитина).

Г. Обнаружение с помощью модифицированного реактива Симона (тест проводится в лабораторных условиях)

Реактивы: $Г_1$ — раствор 1 г нитропруссида натрия в 100 мл 5%-ного водного ацетона; $Г_2$ — раствор 2 г натрия карбоната в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить одну каплю реагента $Г_1$.

3. Добавить одну каплю реагента $Г_2$.

Пурпурная окраска указывает на возможное присутствие амфетамина.

Другие одурманивающие средства могут давать сходную окраску с этим реагентом.

7.4.5. Каннабис (гашиш)

А. Обнаружение с помощью Прочного Синего Б

Реактивы: $А_1$ — смешать тщательно соль Прочного Синего Б с сульфитом натрия; $А_2$ — хлороформ; $А_3$ — 0,1 н водный раствор натрия гидроксида.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить небольшое количество реагента $А_1$.
3. Добавить 25 капель реагента $А_2$ и встряхивать в течение одной минуты.
4. Добавить 25 капель реагента $А_3$ и встряхивать пробирку в течение двух минут.

Пурпурно-красное окрашивание нижнего хлороформного слоя указывает на возможное присутствие каннабиноидов.

Б. Обнаружение с помощью реактива Дюкенуа—Левина

Реактивы: $Б_1$ — раствор 0,4 г ванилина в 20 мл 95%-ного этанола с последующим добавлением 0,5 мл ацетальдегида; $Б_2$ — концентрированная соляная кислота; $Б_3$ — хлороформ.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить 2 мл (около 50 капель) реагента $Б_1$ и встряхивать в течение одной минуты.
3. Добавить 2 мл реагента $Б_2$, встряхивать несколько секунд и оставить стоять на несколько минут.
4. Если окраска начинает развиваться в течение двух-трех минут, добавить 2 мл реагента $Б_3$ и осторожно встряхивать смесь.

Фиолетовая окраска нижнего хлороформного слоя указывает на возможное присутствие гашиша.

Только очень немногие природные вещества дают сходную окраску.

7.4.6. Производные барбитуровой кислоты

А. Обнаружение с помощью реактива Дилль—Копани

Реактивы: $А_1$ — растворить 0,1 г кобальт ацетата тетрагидрата в 100 мл абсолютного метанола и затем добавить 0,2 мл ледяной

уксусной кислоты; A_2 — смешать 5 мл изопропиламина с 95 мл абсолютного метанола.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить три капли реагента A_1.

3. Добавить три капли реагента A_2.

Красновато-пурпурная окраска указывает на возможное присутствие барбитуратов.

Только очень немногие соединения дают сходную реакцию.

7.4.7. Производные 1,4-бензодиазепина

А. Обнаружение с помощью реактива Циммермана

Реактивы: A_1 — раствор 1 г 2,4-динитробензола в 100 мл метанола; A_2 — раствор 15 г калия гидроксида в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить одну каплю реактива A_1.

3. Добавить одну каплю реактива A_2.

Красновато-пурпурная или чернильная окраска указывает на возможное присутствие производных 1,4-бензодиазепина. Многие вещества могут дать сходную окраску.

Б. Обнаружение с помощью соляной кислоты

Реактивы: 2 мл концентрированной соляной кислоты.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.

2. Добавить две капли реагента.

Желтая окраска указывает на возможное присутствие производных 1,4-бензодиазепина.

Многие вещества могут дать сходную окраску.

В. Обнаружение с помощью реактива Витали—Моррена (тест выполняется в лабораторных условиях)

Реактивы: B_1 — концентрированная азотная кислота; B_2 — ацетон; B_3 — 0,1 м этанольного раствора калия гидроксида.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.

2. Добавить 0,5 мл реагента B_1 и упарить на водяной бане досуха.

3. Добавить 5 мл реагента B_2.

4. Добавить 1 мл реагента B_3.

Желтая окраска указывает на возможное присутствие производных 1,4-бензодиазепина.

Другие вещества (содержащие аминогруппу) могут давать сходную реакцию.

Г. Обнаружение с помощью реактива Эрлиха

Реактивы: растворить 1 г п-диметиламинобензальдегида в 10 мл концентрированной ортофосфорной кислоты (ρ = 1,75).

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца на пластинку.
2. Добавить две капли реагента.

Фиолетовая окраска, появляющаяся в течение нескольких минут, указывает на возможное присутствие ЛСД.

Другие соединения также могут образовывать подобную окраску.

7.4.8. Кокаин

А. Обнаружение с помощью тиоцианата кобальта (II)

Реактивы: A_1—16%-ный раствор соляной кислоты; A_2— раствор 2,5 г кобальта (II) тиоцианата в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить одну каплю реагента A_1 и встряхивать 10 секунд.
3. Добавить одну каплю реагента A_2 и снова встряхивать в течение 10 секунд.

Голубая окраска показывает на возможное присутствие кокаина, включая кустарно изготовленный "крэк".

Метаквалон, фенциклидин и некоторые другие вещества дают сходную окраску.

Б. Обнаружение с помощью модицированного реактива тиоцианата кобальта (II)

Реактивы: $Б_1$ — растворить 1 г кобальта (II) тиоцианата в 50 мл 10%-ной уксусной кислоты и затем разбавить раствор 50 мл глицерина; $Б_2$ — концентрированная соляная кислота; $Б_3$ — хлороформ.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить пять капель реагента $Б_1$ и встряхивать в течение 10 секунд. Если в образце присутствует кокаин, голубая окраска развивается немедленно. Если голубая окраска отсутствует, добавить точно такое же количество анализируемого образца. Если и на этот раз голубая окраска не появится, то кокаин в образце отсутствует.

3. Если раствор после операции 2 становится голубым, добавить реагент B_2 и встряхивать несколько секунд. Голубая окраска становится чернильной, если кокаин присутствует в образце. Если окраска становится ненасыщенной, добавить еще одну каплю реагента.

4. Если раствор после операции 3 полностью окрасился в чернильный цвет, добавить 5 капель реагента $Б_3$ и встряхивать до перемешивания смеси. Голубая окраска должна вновь появиться в нижнем хлороформном слое, указывая на присутствие кокаина.

Только очень немногие вещества дают сходную реакцию.

В. Обнаружение метилбензоата

Реактив: раствор 5 г калия гидроксида в метаноле.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить приблизительно 10 капель реагента.
3. Встряхивать пробирку в течение 10 секунд.
4. Сравнить запах в пробирке с запахом метилбензоата (вещество сравнения).

Если запах в пробирке сходен с запахом вещества сравнения— метилбензоата, это указывает на возможное присутствие кокаина.

Только очень немногие вещества будут образовывать вещество со сходным запахом.

7.4.9. Метаквалон, фенциклидин

А. Обнаружение с помощью тиоцианата кобальта (II)

Реактивы: A_1 — 16%-ный раствор соляной кислоты; A_2 — раствор 2,5 г кобальта (II) тиоцианата в 100 мл воды.

1. Поместить небольшое количество анализируемого образца в пробирку.
2. Добавить одну каплю реагента A_1.
3. Добавить одну каплю реагента A_2.

Голубая окраска указывает на возможное присутствие метаквалона или фенциклидина.

Сходную окраску дают кокаин и некоторые другие вещества.

7.5. ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ И ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗЕ

Хромогенные реакции (реакции окрашивания), используемые для детектирования веществ, находящихся под контролем, не являются специфичными, т. е. обычно реагенты взаимодействуют и с другими соединениями, давая сходную окраску.

С другой стороны, по причинам, указанным выше (в начале раздела), результат может быть отрицательным даже в случае присутствия искомого вещества.

Окраски, полученные в результате экспресс-теста, должны быть сравнены с окраской, образованной чистыми веществами сравнения (метчиками), так как восприятие окраски индивидуально и субъективно, что может привести к неверному истолкованию результатов.

ГЛАВА 8

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Современные иммунохимические методы анализа наркотических и других одурманивающих средств отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, простотой исполнения, позволяют одновременно анализировать большое число проб, не требуют дополнительной или специальной очистки пробы или концентрирования и поэтому очень удобны для скрининг-диагностики.

В основе этих методов лежит специфическая реакция антител с молекулами определяемого вещества (антигеном, гаптеном). Для визуализации (детектирования) результатов реакции один из компонентов реакции (гаптен или антитело) метят специальной меткой. В зависимости от природы применяемой метки и способа ее детектирования существует несколько видов иммунохимического анализа (табл. 24).

Таблица 24. **Классификация иммунохимических методов анализа**

Метод	Способ детектирования
Радиоиммунный анализ (РИА)	Радиоактивность
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Ферментная активность
Поляризационный флюороиммуноанализ (ПФИА)	Интенсивность флюоресцентной поляризации
Люминесцентный иммуноанализ (ЛИА)	Интенсивность люминесценции
Спин-иммунологический анализ (СИА)	Электронный спин-резонанс свободных радикалов
Вироиммуноанализ (ВИА)	Цитолиз бактериофагов
Металлоиммуноанализ (МИА)	Атомарные спектры поглощения
Иммуноанализ с помощью частиц и иммунодиффузия (ИД)	Турбодиаметрия
Нефелометрические иммунометоды	Преломление света
Иммуносенсорные методы	Электрический сигнал

Из перечисленных в таблице методов наибольшее распространение в химико-токсикологическом анализе наркотических средств получили ИФА, РИА, ПФИА и иммуноанализ на основе латексной агглютинации.

В настоящее время выпускаются готовые коммерческие наборы реагентов, позволяющих выявлять основные классы одурманивающих средств (опиаты, каннабиноиды, барбитураты, кокаин и др.), с гарантированным пределом обнаружения 300 — 500 нг/мл — диагностикумы фирм "Сива" (США), "Хоффман-ла Рош" (Швейцария), ИФАВ РАН (СНГ), "Эбботт" (США).

8.1. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

В иммуноферментных методах для детектирования реакции "антиген — антитело" в качестве метки (маркера) используются ферменты. Как правило, они представляют собой различные оксидазы, способные окислять (специальное химическое вещество — хромогенный субстрат) с образованием окрашенных продуктов. По интенсивности окраски и судят о присутствии или отсутствии наркотического средства в анализируемой пробе.

По технике выполнения различают два типа иммуноферментного анализа (ИФА): гомогенный ("Сива", ЭМИТ) и гетерогенный (ИФАВ РАН, "Хоффман-ла Рош").

В гомогенном ИФА все компоненты реакции — антитела (антисыворотки), определяемое вещество, меченое определяемое вещество (конъюгат), хромогенный субстрат — находятся в одном агрегатном состоянии — растворе. На первой стадии анализа в реакционной среде присутствуют одновременно три компонента: аликвота анализируемой биопробы, конъюгат (определяемое вещество с ферментной меткой) и антитело (антисыворотка). Вследствие обратимости реакции связывания "антитело — антиген" определяемое вещество биопробы (гаптен) и конъюгат (меченый гаптен) конкурируют между собой за ограниченное число мест связывания антитела.

Меченый антиген, связанный с антителом, не дает окраски вследствие потери активности фермента за счет пространственных затруднений. Меченый антиген получают с помощью специфических химических приемов, в результате чего определяемое вещество ковалентно связывается с ферментом.

На второй стадии анализа к реакционной смеси добавляется хромогенный субстрат, который под действием фермента-метки претерпевает химическое изменение, превращаясь в окрашенное соединение. Полученная окраска регистрируется визуально или с помощью спектральных методов.

В гомогенном ИФА в качестве метки используются следующие ферменты: лизоцим, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа.

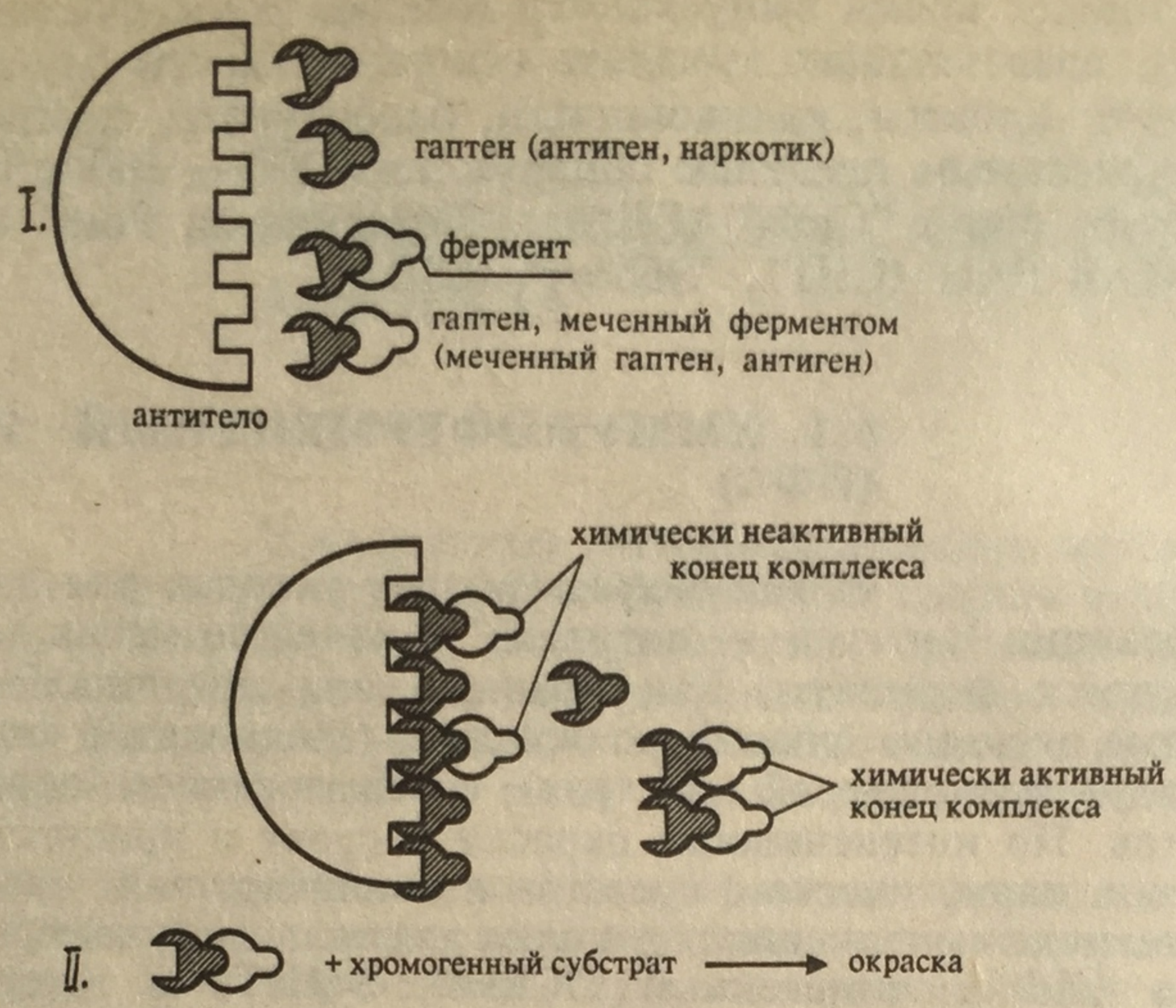


Рис. 4 Гомогенный иммуноферментный анализ

При связывании меченого гаптена с антителом активность фермента-метки в реакции с хромогенным субстратом снижается за счет пространственных изменений белка фермента (блокируется доступ субстрата к ферментативным центрам). Это явление называется торможением. В этом случае окраска анализируемого раствора после добавления субстрата будет прямо пропорциональна концентрации не вступившего в связь с антителом меченого гаптена, т.е. прямо пропорциональна концентрации конкурента — наркотика, находящегося в биопробе.

В наиболее распространенных случаях *гетерогенного ИФА* антитело иммобилизуется на каком-либо твердом носителе, например полистирольных планшетах, пробирках, бусах.

В гетерогенном ИФА предусматривается стадия разделения реагирующих компонентов. Хромогенный субстрат добавляется после стадии, называемой отмывкой. После проведения инкубации реакционной смеси и связывания гаптенов (меченого и немеченого) с антителом на твердой основе непрореагировавшие реагенты удаляются из реакционной смеси. Добавленный хромогенный субстрат взаимодействует с ферментом-меткой, связанным с антителом, иммобилизованным на твердом носителе, и образует соответствующую окраску. Если концентрация определяемого вещества в пробе значительно превышает концентрацию гаптена, меченного ферментом, то после удаления последнего из реакционной смеси в результате отмывания, как не вступившего в реакцию, хромогенный субстрат не будет образовывать окраски (положительный ответ).

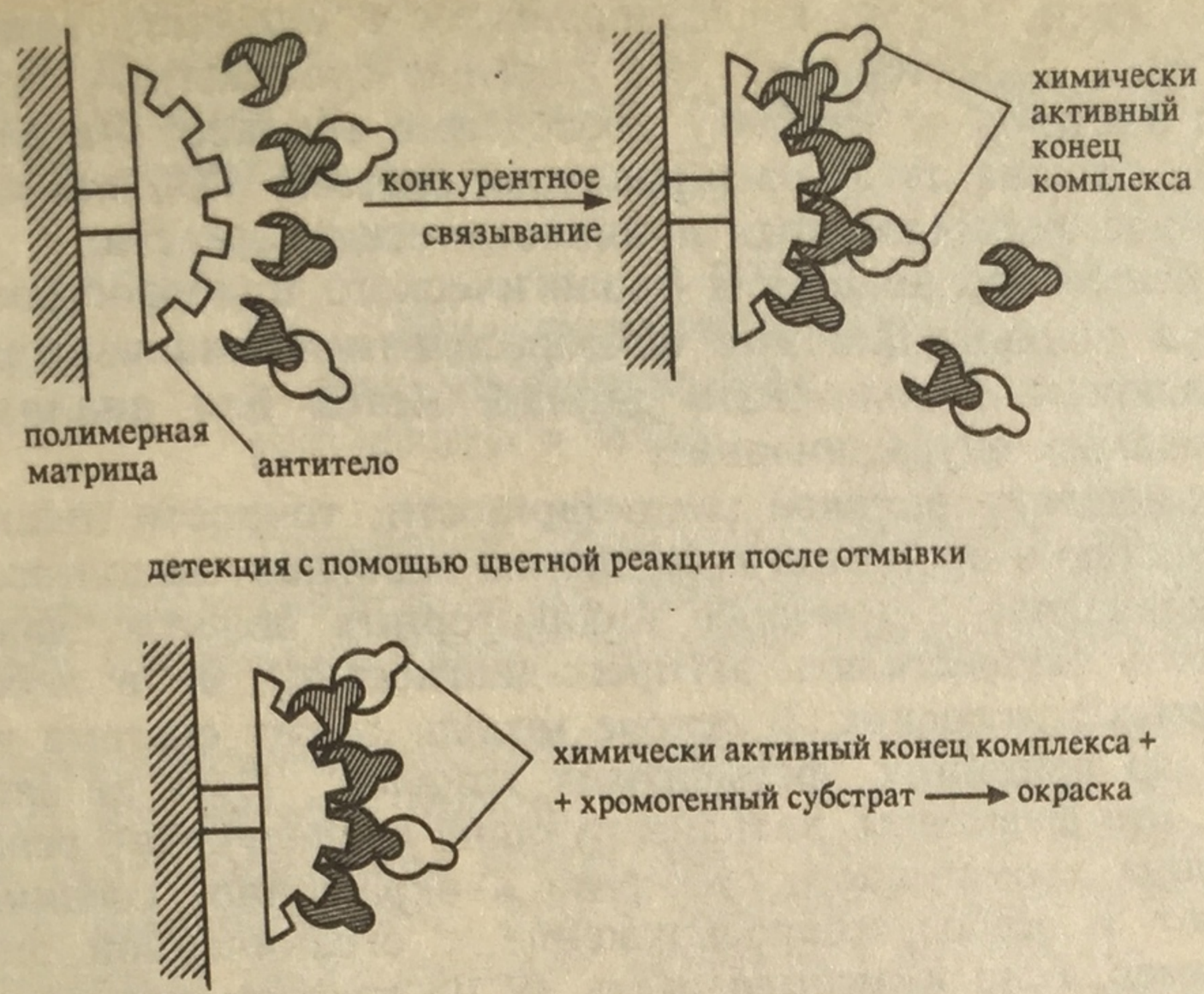


Рис. 5. Гетерогенный иммуноферментный анализ

В гетерогенном методе в качестве метки наиболее часто используются следующие ферменты: пероксидаза, β-галактозидаза, алколин-фосфатаза, реже — ацетилхолиноэстераза, глюкоамилаза и глюкозооксидаза.

Гомогенный ИФА более экспрессный, время проведения анализа занимает от 1 до 30 минут, включая обработку результатов. Предел обнаружения составляет от 10^{-4} до 10^{-6} г/мл. Гомогенный ИФА используется при скрининге большого количества образцов для предварительного установления факта употребления одурманивающих средств. Недостатком гомогенного анализа является достаточно высокий фон.

Гетерогенные методы характеризуются высокой чувствительностью (10^{-6} — 10^{-8} г/мл), но более длительным временем проведения анализа (от 2 до 4 часов).

Наиболее чувствительным и удобным среди иммунологических методов количественного определения наркотических и других одурманивающих средств в биожидкостях является поляризационный иммунофлюоресцентный анализ (ПФИА) (см. раздел 8.2). ПФИА— гомогенный конкурентный метод иммуноанализа. Поляризацию флюоресценции комплекса "антитело — антиген", меченного трассером-флюоресцеином, замеряют прямо в растворе, используя особые свойства метки. Изменение степени поляризации испускаемого флюоресцентного света зависит от степени связывания трассера с антителом. Поляризацию флюоресценции измеряют с помощью специальной оптической системы детекции. ПФИА имеет ряд преимуществ перед ИФА: бóльшую точность (до 200 нг/мл), стабиль-

ность метки, меньшую подверженность влиянию температуры и pH среды, характерному для фермент-субстратных отношений, а также быстроту и простоту проведения анализа. Фирмой "Эбботт" (США) создана автоматизированная система TD_x для мониторинга и анализа лекарственных и наркотических средств.

В нашей стране ВНИИ биологического приборостроения выпускаются поляризационные флюоресцентные анализаторы АФП-2, позволяющие использовать данный метод для анализа средств, вызывающих одурманивание.

Совмещение высокой специфичности, точности анализа с экспрессностью и простотой выполнения позволяет использовать метод иммуноанализа с помощью индикаторных полосок, дающий возможность осуществлять экспресс-диагностику не в лабораторных ("полевых") условиях. В основе метода лежит система детектирования по принципу "ферментных каналов". Суть ее заключается в том, что ферменты, катализирующие последующие реакции превращения хромогенного субстрата в окрашенное соединение, помещают в особое микроокружение с ограниченной диффузией. Например, если иммобилизовать их на твердом носителе, то скорость катализа сопряженных реакций будет выше при нахождении ферментов на поверхности твердой частицы, чем в случае раздельного действия ферментов.

Метод использует два фермента — глюкозооксидазу и пероксидазу. Антитела и глюкозооксидазу ковалентно связывают с поверхностью индикаторной полоски — целлюлозой хроматографической бумаги. Второй фермент — пероксидазу — используют для получения конъюгата с определяемым веществом.

При погружении индикаторной полоски в исследуемый образец (моча, слюна и др.) происходит образование иммунных комплексов между антителом, иммобилизованным на хроматографической бумаге, и присутствующим в анализируемом образце свободным наркотиком пропорционально его концентрации. Затем полоску помещают в раствор, содержащий: а) конъюгат (определяемый наркотик — пероксидаза), б) глюкозу и в) хромогенный субстрат (например, хлорнафтол).

При инкубации конъюгат связывается с вакантными активными центрами антител, при этом при взаимодействии глюкозы с иммобилизованной глюкозооксидазой происходит последовательная генерация перекиси водорода, которая затем окисляет хромогенный субстрат с образованием нерастворимого окрашенного продукта. Концентрация антигена (определяемого вещества) в исследуемом образце обратно пропорциональна интенсивности развиваемой на полоске окраски. Описанный иммунохроматографический метод является принципиально новым и отличается тем, что концентрация вещества определяется не по ферментативной активности конъюгата, а по его хроматографической подвижности.

Благодаря простоте выполнения и возможности стандартизации иммунохроматографический метод имеет большую перспективу. Он может использоваться в отделениях милиции, спецприемниках, патрульных автомобилях и т.д.

8.1.1. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты в ИФА

Поскольку ферменты — белковые катализаторы биохимических реакций — нестабильны, при измерении ферментативной активности следует принимать меры предосторожности.

1. Следует избегать возможного попадания в реакционную смесь химических ингибиторов белков. Многие соли тяжелых металлов, например ртутьсодержащие консерванты, являются ингибиторами ферментов; антикоагулянты, ЭДТА, некоторые метаболиты лекарственных средств также снижают активность ферментов.

2. Следует избегать возможных загрязнений: а) микроорганизмами; б) элементами крови (кровяные клетки часто содержат фермент лактат-дегидрогеназу в концентрации выше, чем в плазме); в) компонентами, которые могут помешать анализу, например аденозин в определении креатининкиназ.

3. Время центрифугирования должно быть как можно меньше во избежание денатурации из-за самонагрева.

4. Необходимо избегать поверхностной денатурации, так как растворы белков имеют тенденцию денатурировать, что приводит к потере их третичной структуры, особенно с увеличением разведения раствора.

5. Биологические образцы для анализа необходимо хранить в холодильнике, но не в морозильной камере.

6. Специфичность реакции может быть снижена присутствием ревматоидного фактора, который дает положительную реакцию в отсутствие желаемых антител.

7. Биологические жидкости, используемые для анализа, могут оказывать влияние на активность фермента-метки за счет солевого состава, изменяющего значение pH и ионную силу анализируемого образца.

8. На результат анализа могут повлиять примесь эндогенного фермента или солевые формы метаболитов, теряющие способность конкурировать в иммунологической реакции за счет связывания с белками биожидкости.

Для уменьшения вероятности получения ложноположительных результатов ИФА используют в комбинации с соответствующими хроматографическими подтверждающими методами.

8.1.2. Возможности и ограничения ИФА наркотических и других одурманивающих средств

Производные амфетамина. ИФА позволяет детектировать амфетамин и метамфетамин с чувствительностью 1 мкг/мл в образцах мочи. Для амфетамина этот метод менее чувствителен, чем РИА, который позволяет проводить определение в моче в диапазоне концентраций от 0,25 до 0,5 мкг/мл. Однако РИА не может быть использован для определения содержания метамфетамина ниже, чем 22 мкг/мл.

Так же как и при использовании любого другого иммунохимического метода, важным вопросом является наличие перекрестных реакций определяемого соединения с другими лекарственными веществами, характеризуемое значением относительной реактивности. Относительная реактивность представляет отношение чувствительности определения данного соединения к чувствительности определения другого при тех же самых условиях (при использовании одного и того же набора реагентов, одного типа антител, конъюгата и т.д.). В табл. 25 даны значения относительной реактивности для d-амфетамина.

Таблица 25. **Относительная реактивность d-амфетамина**

Лекарственное соединение	Концентрация в моче, мкг/мл	Относительная перекрестная реактивность
d-амфетамин	1,0	1,0
Метамфетамин	0,9	1,08
Эфедрин	4,5	0,22
Псевдоэфедрин	4,5	0,22
Фенметразин	0,95	1,05
Метилфенидат	50,0	0,02
Мефентермин	1,6	0,62
Фенилпропаноламин	5,0	0,2
Бензфетамин	24,0	0,04
Индометацин	1,2	0,83
Тренилципрамин	14,0	0,07
Триаминофетан	20,0	0,05
Тирамин НС	3,2	0,32

Как видно из табл. 25, наличие перекрестных реакций с другими лекарственными соединениями может быть причиной ложноположительных результатов при определении амфетаминов.

Производные барбитуровой кислоты. ИФА барбитуратов позволяет детектировать свободный барбитурат трех типов действия: 1) короткого (гексенал), 2) среднего (барбамил), 3) длительного (фенобарбитал). Другие барбитураты могут быть определены при высоких концентрациях. Данные по уровню оп-

ределения барбитуратов в моче и их относительной реактивности приведены в табл. 26.

Таблица 26. **Относительная реактивность барбитуратов и других лекарств**

Лекарственное соединение	Чувствительность, мкг/мл	Относительная перекрестная реактивность
Гексенал	1,0	1,0
Фенобарбитал	2,0	0,5
Этаминал натрия	1,1	0,9
Барбамил	1,8	0,55
Тиопентал	0,7	1,42
Бутабарбитал	1,5	0,66
Ноксирон	50,0	0,02
Мефобарбитал	0,65	1,53
Талбутал	4,2	0,24
Апробарбитал	15,0	0,02
Метабарбитал	50,0	0,02
Барбитал	50,0	0,02
Пробарбитал	50,0	0,02
Дилантин	50,0	0,02

Метод не специфичен для отдельных барбитуратов, однако положительная реакция имеет место, если одно из лекарств, указанных в табл. 26, присутствует. Сравнительное измерение возможности использования различных методов для детекции барбитуратов (ТСХ, ГЖХ, ультрафиолетовая спектрофотометрия, РИА и ИФА) показало, что наименьший процент ложноположительных результатов получен при использовании ИФА (около 2% по сравнению с 3 и 4% для других методов). Кроссреактивность в ИФА барбитуратов значительно ниже, чем у амфетаминов.

Поскольку концентрация барбитуратов в моче и сыворотке колеблется в одном диапазоне концентраций (при содержании в моче от 1 до 5 мкг концентрация в сыворотке составляет 3 мкг), метод может быть использован для определения барбитуратов в моче и сыворотке. Таким образом, если образец мочи детектируется на содержание барбитуратов как отрицательный, проведение аналогичного анализа в сыворотке должно показать отрицательный результат; несоответствие может наблюдаться только при короткодействующих барбитуратах. Чувствительность ИФА барбитуратов коррелирует с чувствительностью РИА для одних и тех же категорий барбитуратов, абсолютная специфичность обоих методов одинакова.

Производные 1,4-бензодиазепина. ИФА 1,4-бензодиазепинов использует конъюгаты фермента с оксазепамом. Оксазепам, общий метаболит для всех бензодиазепинов, обнаруживается в моче пациентов, проходящих курс терапии бензодизепи-

нами. Кроссреактивности с другими лекарственными препаратами в литературе не отмечено, анализ высокоспецифичен, чувствительность метода — 0,5 мкг/мл. Достаточно высокое время полувыведения этого метаболита и высокая чувствительность позволяют детектировать введение в организм около 10 мг диазепама спустя 48 часов.

Метаболиты кокаина. Основными метаболитами кокаина, определяемыми в моче, являются бензоилэкгонин и экгонин. Ввиду плохой растворимости их в органических растворителях при использовании для детекции хроматографических методов (ТСХ, ГЖХ) в ряде образцов не удается определить присутствие метаболитов кокаина, несмотря на введение в организм достаточно высоких концентраций этого соединения. Постановка ИФА исключительно проста, чувствительность — около 1 мкг/мл, анализ высокоспецифичен. Чувствительность РИА выше — около 0,1 мкг/мл, однако простота и доступность ИФА делают его незаменимым при определении этого класса соединений.

Метадон. Метод обнаружения метадона основан на определении свободного метадона и не является специфичным по отношению к метаболитам этого соединения. ИФА позволяет детектировать 0,5 мкг/мл свободного метадона в моче, чувствительность РИА приблизительно в 5 раз выше, а тонкослойной хроматографии — в 4 раза ниже, чем ИФА. Преимущество использования ИФА состоит в быстроте и сравнительной простоте постановки эксперимента.

Опиаты. Применение ИФА для определения опиатов не требует предварительного гидролиза, как при использовании тонкослойной или газожидкостной хроматографии. Метод разработан для детектирования свободного морфина и конъюгатов морфина с глюкуроновой кислотой, обладающих перекрестными реакциями с кодеином. Чувствительность метода по отношению к кодеину выше, чем к морфину. Можно отметить, что использование любого иммунохимического метода не позволяет различать опиаты индивидуально; для их идентификации обычно используют методы газовой и тонкослойной хроматографии, флюорометрию.

Чувствительность определения и относительная реактивность опиатов представлены в табл. 27.

Таблица 27. **Относительная реактивность опиатов**

Лекарственное соединение	Чувствительность, мкг/мл	Относительная реактивность
Морфин	0,5	1,0
Кодеин	0,78	1,28
Морфин глюкуронид	2,6	0,38
Диацетил-морфин	2,4	0,42
Налорфин	15,8	0,06
Меперидин		...
Хлорпромазин		0,001
Дифенолксилат		0,001
Кокаин		0,001

Метадон		0,001
Амфетамин		0,001
Секобарбитал		0,001
Фенобарбитал		0,001
Дигидроморфинон	2,6	0,38
Дигидроморфин	1,8	0,56

8.1.3. Гомогенный иммуноанализ

Проведение ИФА мочи с использованием диагностикумов и оборудования фирмы "Сива". В набор диагностикума на каждое вещество входят:

Реагенты:

1. Реакционная виала, содержащая:

а) антитело на определенное вещество;

б) кофермент НАД (никотинамиддинуклеотид);

в) конъюгат (определяемое вещество, меченное глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой);

г) хромогенное вещество;

д) буфер;

е) консервант.

2. Негативный контроль (холостой образец — моча человека, в которой заведомо отсутствует определяемое вещество, с консервантом — азидом натрия).

3. Позитивный контроль. Контрольный образец, содержащий известное количество определяемого вещества, лиофилизированную мочу человека и азид натрия (0,05%-ный раствор).

Концентрация определяемых веществ (мкг/мл)

11-нор-Δ^9-ТГК-кислота	0,45
Опиаты	1,0
Барбитураты	1,0
1,4-бензодиазепины	1,0
Кокаин (бензоилэкгонин)	3,0
Амфетамины	2,0

4. Калибратор. Контрольный образец, содержащий определяемое вещество в концентрации, являющейся пороговой (cut off) для данного вещества, служит для калибровки прибора.

Концентрация калибратора (мкг/мл)

11-нор-Δ^9-ТГК-кислота	0,1
Опиаты	0,5
Барбитураты	0,5

1,4-бензодиазепины	0,3
Кокаин (бензоилэкгонин)	0,3
Амфетамины	1,0

Калибраторы и контроли нельзя замораживать и хранить при температуре выше 32°С.

А. Проведение анализа

1. Отбор и хранение биообразцов

Образцы мочи (не менее 50 мкл) отбирают в пластиковые или стеклянные контейнеры. Избегать резиновых пробок. Если отобранная проба не анализируется в течение одного дня, ее хранят в холодильнике не более трех дней (для каннабиноидов — 24 часа). Для более длительного хранения мочу необходимо заморозить. Перед анализом пробу оттаивают и доводят до комнатной температуры. Использование консервантов для хранения мочи не рекомендуется.

2. Методика проведения анализа

2.1. Подготовка к анализу

Приготовление калибратора и контролей:

— на этикетках флаконов калибратора, позитивного и негативного контролей поставить дату приготовления;

— снять металлический колпачок и резиновую пробку;

— налить дистиллированную воду в резервуар в объеме 50 мкл дозатором (при анализе на каннабиноиды использовать 100-мкл дозатор) и дать ей отстояться в течение нескольких минут, для того чтобы вышли пузырьки воздуха;

— промыть дозатор. Для этого, удерживая наконечник трубки дозатора над сливной емкостью, поднимать и опускать плунжер до тех пор, пока в трубопроводе не останется пузырьков воздуха. После промывки опустить плунжер вниз;

— поместить наконечник трубки дозатора в держатель так, чтобы он не касался какой-либо жидкости, и поднять плунжер до верха красной стрелки на его цилиндре*;

— ввести наконечник трубки дозатора во флакон с калибратором или контролем так, чтобы он не касался стенок или дна флакона, и опустить плунжер (объем полученного раствора — 3 мл). Эту операцию сделать с калибратором, позитивным и негативным контролями;

— закрыть флакон своей пробкой и осторожно взболтать содержимое круговыми движениями до растворения порошка;

— выдержать полученный раствор калибратора и контролей при температуре 20 — 25°С не менее часа перед использованием.

---

* Вместо дозатора для отбора 3,0 мл дистиллированной воды можно использовать автоматическую пипетку.

Контроль температуры:

— все компоненты для анализа: реакционные виалы, калибратор, позитивный и негативный контроли, дистиллированная вода, образцы мочи для анализа — должны иметь одинаковую температуру в пределах 22 — 25°С.

Включение спектрофотометра:

— включить фотометр и подождать, пока светящаяся надпись "Test in progress" перестанет мигать (≈ 15 минут).

Проверить качество работы прибора (см. п. 2.3).

2.2. Анализ образцов мочи

Анализы проводятся с одинаковой скоростью, без перерывов с 1-й по 9-ю стадию.

Промывать дозатор каждый раз, когда в соединительной трубке появляются пузырьки воздуха.

Поместить две реакционные виалы в держатели виал (Vial Holder).

Удалить и выбросить винтовые колпачки, а резиновые пробки положить на рабочую подставку (Work Station).

Протереть наконечник трубки дозатора обезжиренной тканью и опустить его во флакончик с калибратором так, чтобы он не касался стенок и дна флакона. Поднять плунжер дозатора полностью (до верха красной стрелки). Вынуть наконечник трубки из флакона с калибратором, снова его протереть и поместить его над калибровочной виалой. Опустить плунжер, чтобы ввести калибратор и разбавитель в виалу. Немедленно приступить к следующей стадии.

Протереть наконечник трубки дозатора и опустить его в пробу мочи. Поднять плунжер дозатора полностью. Вынуть наконечник трубки дозатора из пробы, снова ее протереть и поместить над виалой для образца. Опустить плунжер, чтобы ввести образец мочи и разбавитель в виалу.

Закрыть виалы резиновыми пробками.

Вращать держатель виал круговыми движениями до растворения порошка (10 — 15 с). Это время должно быть постоянным от образца к образцу.

Поместить держатель виал в фотометр*. Убедиться, что виала с калибратором находятся слева, а виала с образцом — справа. Нажмите обе виалы вниз, чтобы световая надпись "Insert Vials" погасла.

Поместить карту результатов с цветным блоком в верхнем правом углу в щель фотометра так, чтобы погасла световая надпись "Insert Card". Оставьте карту в этом положении до напечатания результатов (≈ 90 с).

Удалить карту результатов и виалы из фотометра после того, как надпись "Test in progress" погаснет.

---

* Виалы с внешней стороны должны быть чистыми и сухими. Если жидкость разбрызгана на стенках виал, выключить фотометр, вытереть влагу и дать фотометру высохнуть (если влага попала в кюветное отделение), а затем провести контрольный тест, чтобы убедиться, что прибор находится в рабочем состоянии.

Не оставляйте виалы в фотометре — это предохранит прибор от самокалибровки.

Подождите 15 секунд, прежде чем начинать следующее измерение.

2.3. Контроль качества работы прибора и диагностикума

Контроль качества работы прибора проводится ежедневно, согласно описанной выше процедуре, используя вместо образца мочи негативный и позитивный контроли, т.е. помещая флаконы с контролями в фотометр вместо образца мочи. Если система функционирует нормально, то позитивный контроль будет давать положительный результат, а негативный — отрицательный результат, причем полученные величины абсорбции должны укладываться в интервал, указанный на этикетке коробки с реакционными виалами.

3. Интерпретация результатов

Используемые в диагностикуме калибраторы содержат строго определенное количество определяемого вещества, что позволяет использовать их в качестве веществ сравнения.

3.1. Положительный результат. Проба мочи, в которой обнаруживается вещество с величиной абсорбции, равной или большей, чем таковая у калибратора, считается положительной ("+"). Положительный результат указывает только на присутствие искомых и(или) близких к ним по структуре соединений, но не на степень интоксикации.

3.2. Отрицательный результат. Проба мочи, которая дает величину абсорбции ниже, чем таковая у калибратора, считается отрицательной ("—"). Это означает, что в анализируемой пробе определяемое вещество отсутствует вовсе либо присутствует в таких низких концентрациях, которые не определяются данным методом.

4. Возможные ошибки анализа

Если значения величины абсорбции для позитивного и негативного контролей находятся вне пределов интервала, указанных на коробке с реакционными виалами, это может быть причиной следующих факторов:

4.1. Реагенты разложились. Выбросить виалы, содержащие обесцвеченные реагенты.

4.2. Контроль и калибратор испортились из-за неправильного хранения.

4.3. Калибратор и контроль неправильно приготовлены.

4.4. Неправильная дозировка разбавителя, калибратора или контролей.

4.5. Температура дистиллированной воды была не 22 — 25°С.

4.6. Не была соблюдена непрерывность стадий анализа.

4.7. Был использован не тот дозатор (100-мл дозатор используется только для каннабиноидов).

4.8. При проведении анализа были использованы реакционные виалы из разных партий или хранившиеся при разных условиях.

4.9. Резервуар дистиллированной воды содержит пузырьки воздуха.

8.1.4. Поляризационный флюороиммуноанализ мочи на вещества, вызывающие одурманивание

А. Анализ с помощью ТДx-анализатора фирмы "Эбботт" (США)

Исследование проводится с использованием наборов реагентов отдельно на каждое анализируемое вещество или группу веществ: опиаты, барбитураты, бензодиазепины, каннабиноиды, амфетамин-метамфетамин, амфетамин, метамфетамин, кокаин, метадон, фенциклидин, эфедрин, фенобарбитал, барбамил.

1. Отбор пробы и хранение образцов

Образцы мочи должны быть собраны в стеклянные флаконы емкостью 100 мл (для иммунологических анализов — 1 мл), опломбированы и оформлены сопроводительными документами. Хранить образцы мочи следует в холодильнике при температуре —12 — 18°С в замороженном состоянии. Перед выполнением анализа размороженные образцы следует хорошо перемешать.

2. Материалы и оборудование:

— прибор для измерения поляризации флюоресценции — ТДx-анализатор;

— полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 200 мкл;

— измерительные кюветы;

— катриджи (патроны) для образцов;

— карусели для проведения калибровки и анализа;

— стандартные растворы анализируемых веществ;

— 0,1 М фосфатный буфер для анализа с добавлением 1 г/л бычьего гамма-глобулина и 1 г/л азида натрия (консервант) pH=7,4;

— набор реагентов для определения анализируемых веществ, содержащий растворы антисыворотки, трассера, буфера.

3. Методика проведения анализа

3.1. Калибровка. В карусель для калибровки поместить 12 измерительных кювет и 12 катриджей. В катриджи внести не менее 60 мкл каждого из 6 стандартов (делается в дубле) с помощью автоматической пипетки. Поместить карусель и набор реагентов для анализа конкретного соединения или группы веществ в прибор ТДx-анализатор. Нажать клавишу "RUN". После выполнения калибровки прибор готов к анализу образцов мочи. Калибровка проводится для каждого нового набора реагентов, но не реже одного раза в месяц.

3.2. Анализ образцов мочи. В карусель для анализа поместить необходимое количество измерительных кювет и катриджей, соответствующее количеству образцов (максимальное количество — 20 шт.). В катриджи внести не менее 60 мкл каждого из образцов мочи. Поместить карусель и набор реагентов для анализа конк-

ретного соединения или группы веществ в ТД$_x$-анализатор и нажать клавишу "RUN". Прибор автоматически проводит анализ в течение 15 — 20 минут и выдает распечатку с указанием концентрации анализируемого вещества, обнаруженного в образцах мочи.

При получении положительного результата, т.е. когда концентрация анализируемого вещества превышает пороговую концентрацию, требуется провести дальнейшее исследование образца мочи подтверждающими альтернативными методами: хромато-масс-спектрометрией, ГЖХ, ВЭЖХ.

При отрицательном результате не требуется проведения дальнейшего исследования на данное анализируемое соединение или группу веществ.

3.3. Контроль качества. Проводится ежедневно перед выполнением анализа, согласно обычной процедуре анализа (см. раздел 3.2), но с использованием вместо образца мочи стандартных растворов с определенной концентрацией вещества.

Если система функционирует нормально, то отклонения в концентрациях стандартов не должны превышать диапазон, указанный на этикетке коробки набора реагентов.

4. Аналитические характеристики наборов реагентов

4.1. Пределы обнаружения (нг/мл)

Наборы реагентов на:	опиаты	25
	барбитураты	60
	каннабиноиды	10
	бензодиазепины	40
	амфетамин-метамфетамин	10
	амфетамин	30
	метамфетамин	25
	эфедрин	30
	метадон	10
	фенциклидин	5
	кокаин	30
	фенобарбитал	90
	барбамил	50

4.2. Пороговая концентрация (достоверно устанавливаемая положительная концентрация соединения) (нг/мл)

Наборы реагентов на:	опиаты	200
	барбитураты	500
	каннабиноиды	25
	бензодиазепины	200
	амфетамин-метамфетамин	300
	амфетамин	500
	метамфетамин	300
	эфедрин	500
	метадон	250
	фенциклидин	75
	кокаин	300

фенобарбитал	500
барбамил	300

4.3. Специфичность. Специфичность антител обеспечивает проведение анализа на группу веществ или на конкретно определяемое вещество в присутствии соединений из других фармакологически активных групп или их метаболитов.

5. Условия хранения и применения набора реагентов.

Набор реагентов рассчитан на проведение 100 анализов без учета расхода реагентов на калибровку и контроль качества.

Сохранность набора в течение всего срока годности (1 год) обеспечивается путем хранения его при температуре +2 — 4°С.

Б. Анализ с помощью флюоресцентного поляризационного АФП-2

1. Анализ с использованием комбинированного реагента

Комбинированный реагент для анализа на конкретное вещество (или на группу веществ) представляет собой предварительно полученный иммунный комплекс антител с антигеном, меченным флюоресцеином (трассером). Реагент поступает в готовом виде, при необходимости его можно приготовить следующим образом: раствор трассера на данное вещество в концентрации 10 нМ/л на фосфатном буфере для анализа смешивают в равных объемах (1:1) с раствором соответствующей антисыворотки на том же буфере в разведении, соответствующем 70%-ному титру (титр определяется при необходимости методом раститровки).

1.1. Отбор пробы и хранение образцов мочи аналогичны пункту 1.

1.2. Материалы и оборудование:

— прибор для измерения поляризации флюоресценции АФП-2 (можно использовать также ТД$_x$-анализатор в ручном режиме работы);

— полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 5 до 50 и от 200 до 1000 мкл;

— измерительные кюветы;

— карусель для проведения калибровки и анализа;

— калибровочные растворы анализируемых веществ на буфере "искусственная моча" или на моче (с добавкой 0,1%-ного NaN_3);

— 0,1 М фосфатный буфер для анализа с добавлением 1 г/мл бычьего гамма-глобулина и 1 г/л натрия азида, pH=7,4;

— комбинированный реагент для определения анализируемых веществ.

1.3. Методика проведения анализа

---

* Производство ВНИИ биологического приборостроения. 123371, Москва, Волоколамское шоссе, 75.

1.3.1. Калибровка. В кюветы для измерения полуавтоматической пипеткой отмеривают по 10 мкл калибровочных растворов вещества (делается в дубле) и добавляют 1 мл комбинированного реагента. В другие кюветы отмеривают по 10 мкл тех же калибровочных растворов и добавляют 1 мл буфера для анализа (для определения фона мочи). Инкубируют 30 минут при комнатной температуре. Затем на поляризационном флюориметре каждую кювету измеряют на интенсивность пропускаемого света при вертикальном (V) и горизонтальном (H) потоке лучей с усилением прибора 10 ед. Рассчитывают поляризацию флюоресценции каждого калибратора с учетом вычитаемого фона мочи, используя формулу

$$мР = \frac{(I^{V}_{кон} - I_{фон}) - (I^{H}_{кон} - I_{фон})}{(I_{кон} - I_{фон}) + (I_{кон} - I_{фон})} \cdot 1000, \text{ где}$$

V — режим измерения интенсивности при вертикальном потоке луча;
H — режим измерения интенсивности при горизонтальном потоке луча;
мР — поляризация флюоресценции (миллиполяризация);
$I_{кон}$ — интенсивность конечная;
$I_{фон}$ — интенсивность фоновая.

По результатам анализа калибраторов вещества строят калибровочный график зависимости величины мР от логарифма концентраций вещества в мкг/мл. На рис. 6 изображен примерный калибровочный график эфедрина в моче при использовании соответствующей антисыворотки и трассера.

1.3.2. Анализ образцов мочи. В кюветы полуавтоматической пипеткой отмеривают по 10 мкл образцов мочи (делается в дубле) и добавляют 1 мл комбинированного реагента. В другие кюветы отмеривают по 10 мкл тех же образцов мочи и добавляют 1 мл буфера для анализа. По калибровочному графику (6) определяют концентрацию анализируемого вещества в образце мочи. Если рассчитанное значение мР не укладывается в график 6 (например, при значительных концентрациях вещества), то данный образец мочи разбавляют количественно дистиллированной водой и проводят повторный анализ.

Если необходим не количественный, а лишь качественный анализ, то стадия инкубации (30 мин) исключается, что значительно сокращает время анализа.

В качественном и количественном анализе вещества результат считается положительным, если найденная концентрация превышает пороговую, которая должна быть указана индивидуально для каждого вещества с используемым комбинированным реагентом.

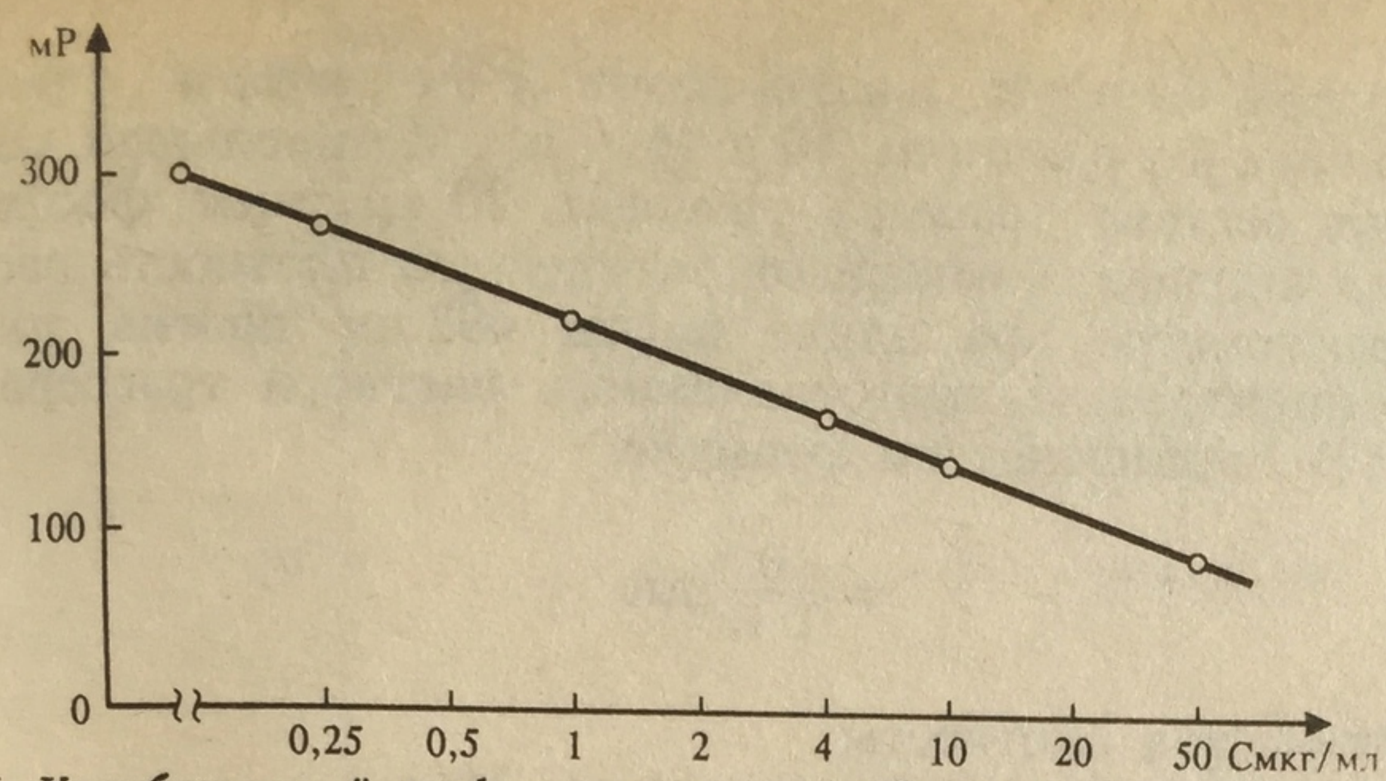


Рис. 6. Калибровочный график определения эфедрина в моче

Данный анализ является скрининговым, поэтому при положительном результате необходимо получить подтверждение другим методом соответствующей чувствительности (ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ/МС). При отрицательном результате не требуется проведения дальнейшего исследования на данное анализируемое соединение.

1.3.3. Контроль качества реагента. Проводится ежедневно, согласно обычной процедуре анализа, с использованием стандартных растворов с определенной концентрацией вещества. Перекалибровку рекомендуется проводить не реже 2 раз в месяц.

1.4. Аналитические характеристики комбинированного реагента. Пределы обнаружения, пороговые концентрации и специфичность определяемых веществ с использованием соответствующего комбинированного реагента указываются на упаковочной коробке или в специальном приложении.

1.5. Условия хранения и применения реагента. Комбинированный реагент сохраняют в стеклянном флаконе в темном месте при температуре +2 — 4°С, срок годности — 1 год с момента изготовления.

2. Анализ с использованием отдельно приготовленных реагентов

Используются те же трассер и антисыворотка на определяемое вещество, что и в случае комбинированного реагента. Анализ проходит следующим образом: 10 мкл калибратора (образца мочи) отмеривают в кювету для измерения, добавляют 0,5 мл раствора антисыворотки с 70%-ным титром и раствор трассера в концентрации 10 нМ/л. Далее — аналогично процедуре анализа с комбинированным реагентом. Особенность данного анализа состоит в том, что и в качественном, и в количественном анализе отсутствует стадия инкубации, а измерения на приборе делают сразу после добавления реагентов.

2.1. Приготовление реагентов

Приготовление рабочего раствора трассера в концентрации 10 нМ / л. Метанольный концентрированный раствор трассера разводят 20-кратным фосфатным буфером для анализа и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 492 нм против того же буфера. Концентрацию приготовленного раствора трассера (полуфабриката) определяют по формуле

$$c = \frac{D}{L \cdot E}, \text{где}$$

D — оптическая плотность;
c — концентрация раствора трассера, М/л;
L — толщина кюветы, см;
E — коэффициент экстинкции трассера, равный $8{,}78 \cdot 10^4$ л $\cdot$ М$^{-1}$ $\cdot$ см$^{-1}$.

Определив исходную концентрацию приготовленного раствора, разводим его фосфатным буфером для анализа до рабочей концентрации 10 нМ/л.

Приготовление рабочего раствора антисыворотки. Рабочий раствор антисыворотки готовится исходя из 70%-ного титра. Например, титр антисыворотки равен 1:500. Значит, данную антисыворотку (лиофилизированную) необходимо развести дистиллированной водой в 500 раз (1 объем антисыворотки в 500 объемах воды). Данный раствор антисыворотки готов к анализу.

В случае если необходимо определить 70%-ный титр антисыворотки, т. е. ее разведение, при котором связывание с трассером проходит на 70%, используют метод раститровки. Для этого в первую измерительную кювету вносят 0,1 мл цельной антисыворотки и разводят ее 0,9 мл фосфатного буфера для анализа (получаем разведение 1:10). Во вторую кювету вносят 0,5 мл фосфатного буфера и 0,5 мл раствора антисыворотки из первой кюветы, перемешивают (разведение 1:20) и 0,5 мл отсюда переносят в третью кювету и так далее, вплоть до конечного разведения 1:5120. В последнюю кювету наливают 0,5 мл буфера. Далее во все кюветы вносят рабочий раствор трассера (10 нМ/л) по 0,5 мл. Измеряют величину мР на поляризационном флюориметре (можно проводить без вычитания фона). Строят график раститровки отношения величины мР к разведению антисыворотки (рис. 7). Принимая за 100% перепад мР между верхним и нижним плато кривой, находим 70% связывания и определяем соответствующее разведение антисыворотки.

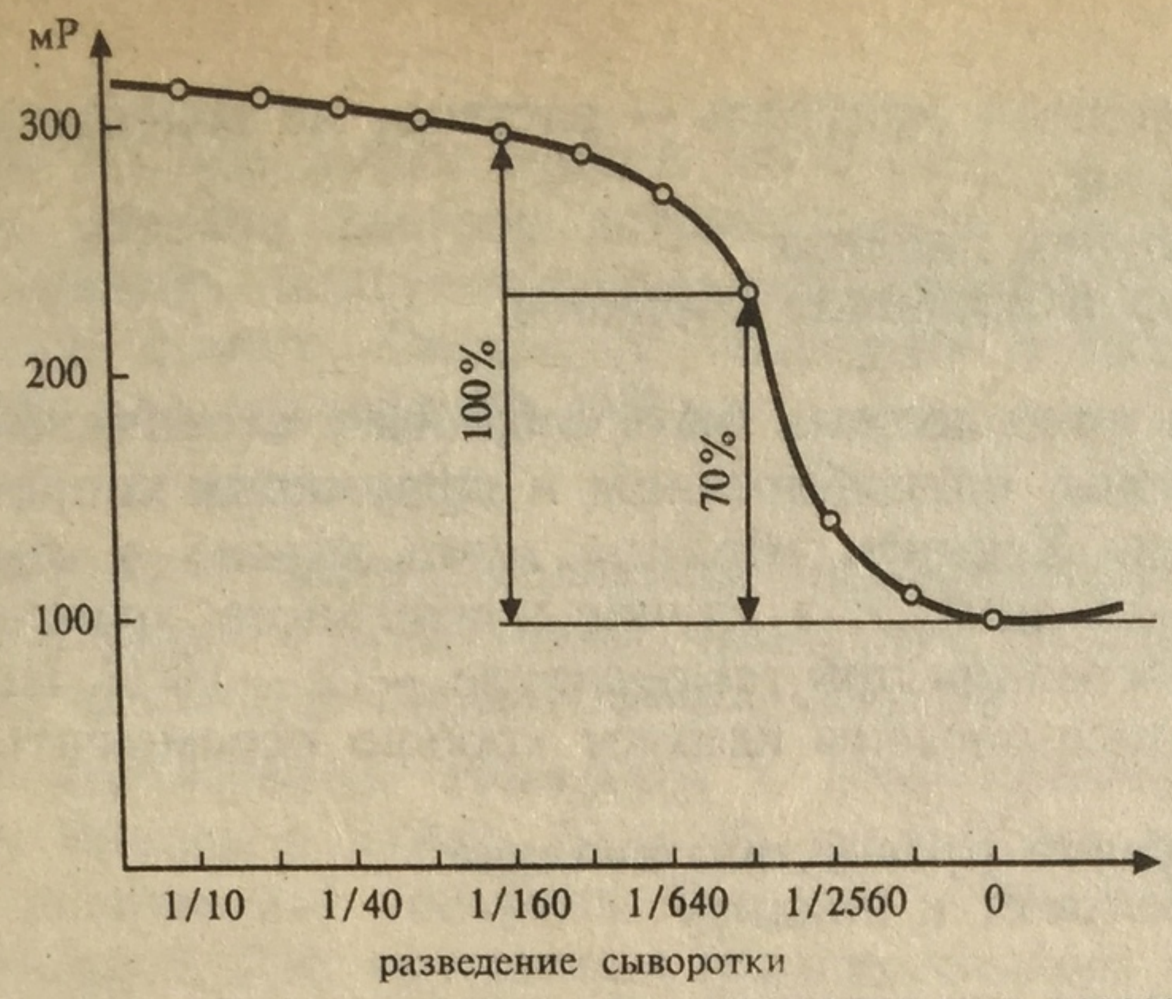


Рис. 7. Определение титра антисыворотки при ее раститровке трассером

8.1.5. Гетерогенный иммуноанализ

А. Обнаружение средств, вызывающих одурманивание, с помощью отечественных диагностикумов*

Выпускаются диагностикумы для обнаружения алкалоидов опия, производных барбитуровой кислоты, каннабиноидов и эфедрона.

В набор диагностикума входят 10 реагентов, один полистирольный планшет на 96 лунок для проведения иммуноферментного анализа и необходимые приспособления.

Реагенты:

1. 1,0 моль/л натрийкарбонатный буферный раствор с бактериостатиком, pH=9,6 ± 0,3 (P_1).
2. Модифицированное (меченое) определяемое вещество для адсорбции на планшете, лиофилизированное (P_2).
3. 1,5 моль/л калийфосфатный буферный раствор с бактериостатиком, pH=7,4 ± 2 (P_3).
4. 12,5%-ный раствор детергента типа твин-20 (P_4).
5. Позитивный контроль определяемого вещества с концентрацией 10 мкг/мл, раствор с бактериостатиком (P_5).
6. Антитело, меченное ферментом пероксидазой,— конъюгат, 40 ± 10 мкг, лиофилизированное (P_6).
7. 1,0 моль/л фосфатно-нитратный буферный раствор с бактериостатиком (P_7).
8. о-Фенилендиамин, 8 мг (беречь от света!).
9. Гидропирит.

---

* Институт физиологически активных веществ РАН, руководитель группы — доктор химических наук О.Ю. Полевая.

10. Негативный контроль — раствор, не содержащий определяемого вещества.

1. Проведение анализа

1.1. Отбор и хранение образцов

Образцы мочи должны быть собраны в стеклянные или пластиковые флаконы, опломбированы и оформлены сопроводительными документами. Хранить образцы мочи можно в холодильнике в течение 2 — 3 дней, а в случае длительного хранения — в замороженном состоянии при температуре —12 —18°С. Перед анализом размороженные образцы следует хорошо перемешать.

1.2. Методика проведения анализа

2.1. Подготовка к анализу

Приготовление рабочих растворов:

— реагент 1 (P_1) разводят в 20 мл дистиллированной воды; хранить не более 10 дней при температуре 4 — 6°С (раствор 1);

— P_2 растворить в 20 мл раствора 1. Использовать в течение 1 часа. Не хранить (раствор 2);

— P_3 растворить в 600 мл дистиллированной воды. Хранить не более 7 дней при температуре 4 — 6°С (раствор 3);

— P_4 развести в 600 мл раствора 3 и использовать для промывки планшетов. Хранить не более 7 дней при температуре 4 — 6°С (раствор 4);

— P_5 растворить в 20 мл раствора 4 до концентрации определяемого вещества 500 нг/мл. Данный раствор является позитивным контролем (раствор 5). Раствор 5 использовать для приготовления калибровочных растворов в количественном варианте ИФА. Хранить не более 5 часов при температуре 4 — 6°С;

— P_6 растворить в 5 мл раствора 4. Хранить не более 24 часов при температуре 4 — 6°С (раствор 6);

— P_7 развести в 21 мл дистиллированной воды. Хранить не более 10 дней при температуре 4 — 6°С (раствор 7);

— одну таблетку P_8 растворить в 21 мл раствора 7, добавив 0,05 мл раствора перекиси водорода, который готовят путем растворения гидропирита в 50 мл дистиллированной воды. Раствор перекиси водорода пригоден к использованию, если оптическая плотность раствора при длине 230 нм составляет 1,2 ± 0,05 при разведении в 15 раз.

Адсорбция антигена — модифицированного морфина — на планшете. Планшеты предварительно обрабатывают спиртом (20 мл на один планшет, спирт можно использовать повторно до 3 раз) и высушивают в термостате. Во все лунки внести по 0,2 мл раствора 2. Адсорбцию проводить 18 часов при температуре 4 — 6°С. Затем раствор 2 удалить из планшета встряхиванием. После промывки планшеты с адсорбированным антигеном могут храниться в условиях холодильника в течение 5 дней.

Промывка. Во все лунки внести по 0,2 мл раствора 4. Через одну минуту удалить раствор встряхиванием планшета. Следы раствора 4 удалить постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге. Операцию повторить 3 раза. Промытый планшет готов для проведения ИФА.

2.2. Анализ образцов мочи

Анализ образцов мочи проводится одновременно с анализом растворов негативного, позитивного контролей и стандартных (калибровочных) растворов определяемых веществ.

Внесение позитивного контроля и стандартных растворов СР в лунки. Внести в лунки A_1 и B_1 по 0,05 мл раствора 5. В лунке A_1 — позитивный контроль. В лунки с B_1 по H_1 внести по 0,05 мл раствора 4. Для построения градуировочного графика приготовить СР №2 — 8 с концентрацией определяемого вещества 250, 127, 62, 31, 15, 5 и 7 мг/мл соответственно путем последовательного разведения в 2 раза раствором 4. Начиная с лунки B_1 из объема 0,1 мл переносить последовательно по 0,05 мл в последующие лунки до H_1. Из лунки H_1 0,05 мл следует удалить. После окончания этой процедуры в каждой лунке с A_1 по H_1 должно быть по 0,05 СР.

Возможно также приготовить на планшете второй ряд СР.

Внесение анализируемых образцов мочи. Все пробы мочи разводят в 10 раз. Внести каждый разведенный в 10 раз образец мочи в две лунки по 0,05 мл в каждую.

Внесение отрицательного контроля. Отрицательный контроль (P_{10}), предварительно разведенный в 10 раз аналогично операции 2.2.2, вносят в лунки A_{11} и A_{12} по 0,05 мл.

Связывание антигена с антителами, меченными пероксидазой хрена (инкубация). Раствор 6 вносят по 0,05 мл во все лунки, инкубирование проводят в течение 5 минут на встряхивателе (шейкере) и в течение 60 минут в биологическом термостате при температуре 37 ± 2°С.

Отмывку планшета проводят аналогично промывке.

Внесение хромогенного субстрата. Раствор субстрата готовят непосредственно перед внесением и сразу же вносят по 0,2 мл во все лунки планшета, выдерживают 20 — 15 минут (в зависимости от качества воды и других неучитываемых факторов) при комнатной температуре и останавливают реакцию, добавляя во все лунки планшета по 0,025 мл раствора соляной или серной кислоты с концентрацией 2 моль/л. Добавление кислоты для остановки реакции необходимо производить максимально быстро, чтобы интервал времени между добавлением кислоты в первую и последнюю лунки был минимальным.

1.3. Интерпретация результатов

Результаты анализа оценивают визуально, сравнивая окраску лунок стандарта с окраской лунок в исследуемых пробах (качественный анализ или спектрофотометрический при длине волны 492 нм (количественный анализ).* Концентрацию морфина в исследуемых пробах определяют по градуировочной зависимости концентрации стандарта морфина от соответствующей средней оптической для параллельных определений в полулогарифмических координатах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунологические методы/Под ред. Г. Фримеля. М.: "Медицина", 1987.
2. *Ковалев И.Е., Полевая О.Ю.* Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. М.: "Наука", 1985.
3. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: "Высшая школа", 1991.
4. Новые методы иммуноанализа/Под ред. У.П. Коллинза. М.: "Мир", 1991.
5. Иммунология/Под ред. У. Пола. М.: "Мир", 1988.
6. Иммуноферментный анализ/Под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. М.: "Мир", 1988.
7. *Еремин С.А.* Иммунохимический анализ лекарств и органических соединений//Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. 1989. №1. Т. 34. С. 46 — 51.
8. Иммунологические методы исследований/Под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. М.: "Мир", 1988.
9. *Ирвинг Л.В., Лерой Е.Х., Уильям Б.В.* Введение в иммунологию. М.: "Высшая школа", 1983.

---

* Количественный анализ можно провести на анализаторе колориметрическом иммуноферментном АКИ-Ц-01.

ГЛАВА 9

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

В 1903 г. в "Трудах Варшавского общества естествоиспытателей" была опубликована работа русского ученого М.С. Цвета "О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу". Это открытие дало начало развитию нового аналитического метода — *хроматографии.* Хроматография в настоящее время — обширная область науки, охватывающая разнообразные хроматографические методы. Основные направления ее практического применения — получение информации о качественном составе и количественном содержании разделяемой смеси, о физико-химических свойствах компонентов, очистка веществ, препаративное выделение отдельных компонентов смеси. Особенностью хроматографических методов является то, что сначала смесь разделяется на отдельные компоненты, а затем сигнал от каждого компонента регистрируется.

Хроматография — это область науки, изучающая движение зоны вещества (или группы веществ) в потоке одной (или нескольких) фазы, движущейся относительно другой фазы или нескольких фаз.

Из этого определения следует, что хроматография как физико-химический процесс основана на различных скоростях движения и размывания концентрационных зон компонентов, которые движутся в потоке подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы. При этом следует иметь в виду, что исследуемые вещества находятся в обеих фазах. Отсюда необходимым условием разделения компонентов является различие в равновесном распределении соединений между подвижной и неподвижной фазами (схема 21).

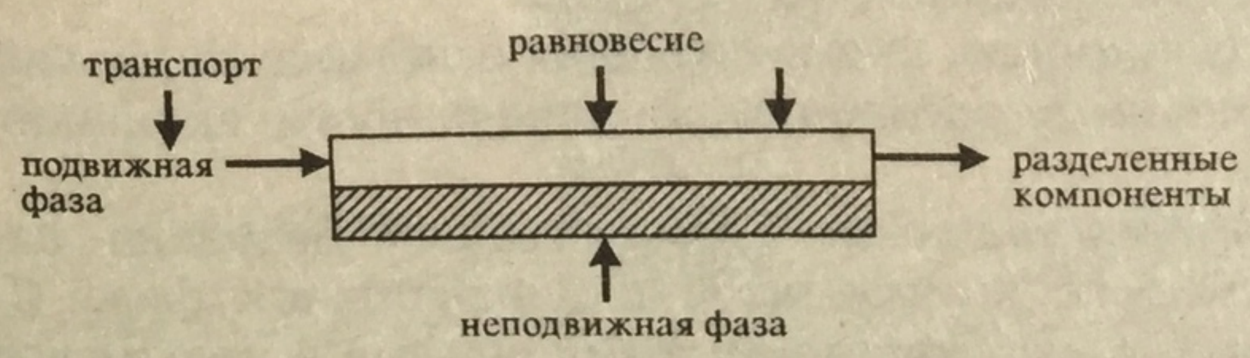


Схема 21

Если в данную схему включить узел ввода пробы, детектирующее устройство и графопостроитель, мы получим принципиальную схему хроматографа — прибора, позволяющего получать характеристики хроматографического разделения (схема 22).

Принципиальная схема хроматографа

подвижная фаза → узел ввода → хроматографическая колонка (пластинка) → детектор → графопостроитель → хроматограмма

Схема 22

Разнообразие хроматографических методов приводит к необходимости их классифицировать (классификация ИЮПАК).

1. По основным методам

Фронтальная хроматография представляет собой методику разделения, в соответствии с которой образец (жидкость или газ) непрерывно вводят в хроматографический слой.

Элюентная хроматография предусматривает пропускание элюента через хроматографический слой после ввода образца.

Вытеснительная хроматография основана на использовании элюента, который содержит соединение, более эффективно удерживаемое хроматографическим слоем, чем компоненты исследуемого образца.

2. По применяемым фазам

В этой классификации первое слово характеризует подвижную фазу, а второе — неподвижную. Жидкая неподвижная фаза закреплена на твердом носителе.

В *газовой хроматографии (ГХ)* различают *газожидкостную (ГЖХ)* и *газотвердую (ГТХ)*, а в жидкостной (ЖХ) — жидкость-жидкостную (ЖЖХ), жидкость-твердую (ЖТХ) и жидкость-гелевую (ЖГХ). Для классификации по применяемым фазам выбирают термин, характеризующий доминирующий эффект.

3. По механизмам разделения

Адсорбционная хроматография основана на различиях в сродстве компонентов к адсорбции на поверхности активного твердого вещества.

Распределительная хроматография основана на различиях в растворимости компонентов в неподвижной фазе (ГЖЖ) или на различиях в растворимости компонентов в подвижной и неподвижной фазах (ЖХ).

Ионообменная хроматография основана на различии в способности компонентов к ионному обмену.

Проникающая хроматография основана на эффектах выделения по таким причинам, как различия размеров и(или) формы молекул, различие зарядов (хроматография на молекулярных ситах, эксклюзионная хроматография ионов, гельпроникающая хроматография).

4. По применяемой технике

На практике обычно пользуются классификацией по применяемым фазам или по механизмам. Классификация по применяемой технике скорее указывает на технику эксперимента и позволяет получить дополнительную информацию об используемом методе. Различают колоночную (КХ), бумажную (БХ), тонкослойную (ТСХ), капиллярную хроматографии.

5. По специальным методам

Среди специальных методов различают хроматографию с программированием температуры, с программированием потока, с высаливанием, селективное, ступенчатое и градиентное элюирование, двухмерную хроматографию, хроматографию с обращенными фазами.

Высокоэффективные жидкостная (ВЭЖХ) и тонкослойная хроматографии (ВЭТСХ), согласно изложенным типам классификации, формально относятся к новым типам разделения. Тем не менее необходимо отметить, что ВЭЖХ и ВЭТСХ, являясь современными формами реализации классических методов, не только улучшают эти варианты, но и представляют собой качественно новый уровень хроматографического разделения, что и позволяет выделить их в специальные методы.

Существующие многочисленные варианты хроматографии можно представить следующим образом (табл. 28).

Таблица 28. **Варианты хроматографического разделения**

Тип транспорта	Тип хроматографии	Тип равновесия	Пример хроматографических методов
Гидродинамический поток			
а) газ	Газовая	Адсорбция	Адсорбционная
б) жидкость	Жидкостная	Растворение	Распределительная
		Ионный обмен	Ионообменная
		Образование комплексов	Ион-парная, лигандообменная
		Ограниченная диффузия	Гелевая
Электрический ток	Электрофорез	Градиент напряжения	Зональный изотахофорез

Пределы использования различных вариантов хроматографического разделения в зависимости от молекулярной массы анализируемых веществ видны из схемы 23.

Область оптимального применения различных вариантов хроматографии

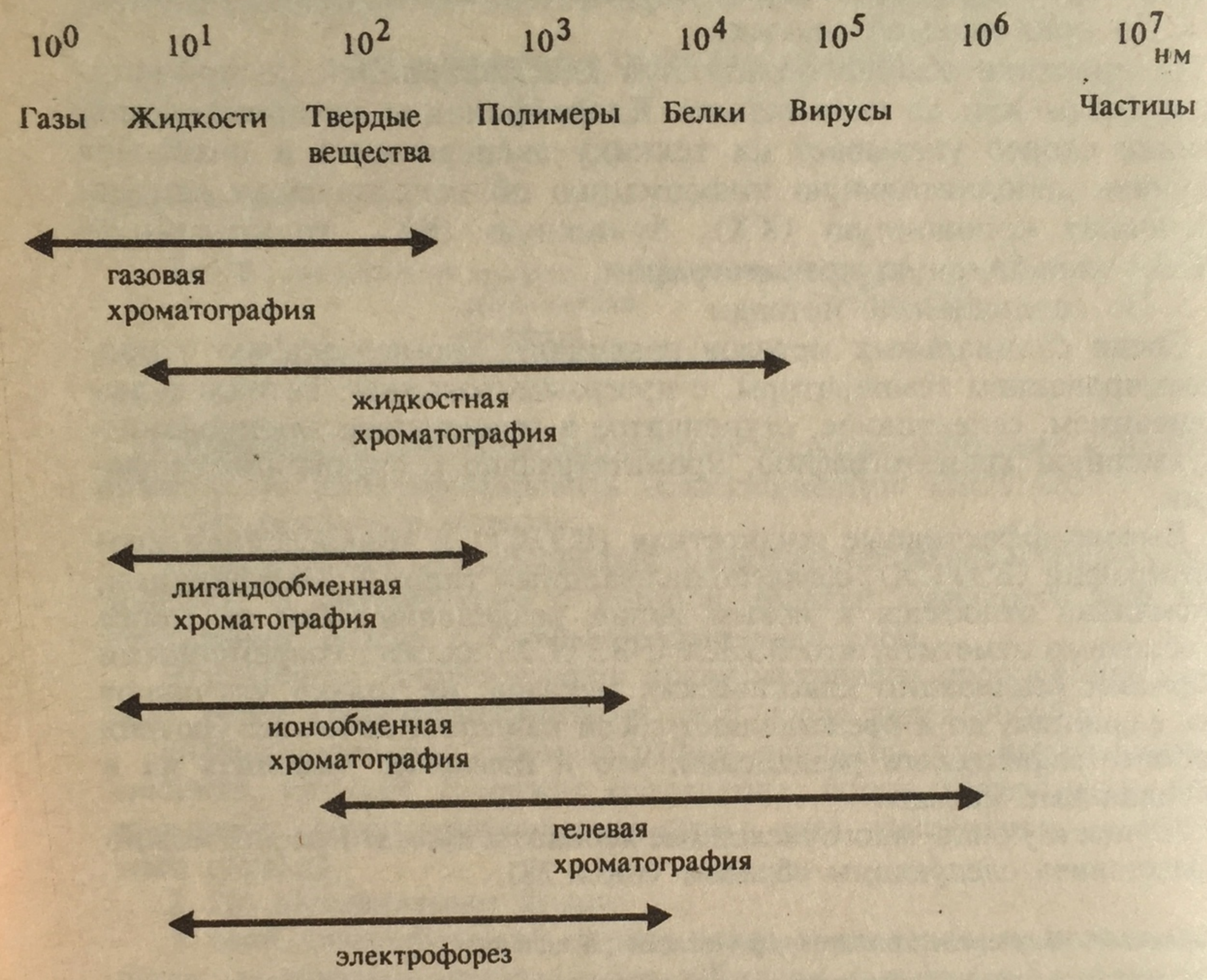


Схема 23

6. Некоторые основные термины и определения хроматографии

Хроматограмма — кривая, отражающая зависимость концентрации компонентов смеси, выходящих с потоком подвижной фазы из колонки, с момента начала разделения (рис. 8). На хроматограмме различают базовую линию (фоновая линия) и хроматографические пики. Фоновая (базовая) линия представляет собой часть хроматограммы, когда из колонки выходит только элюент или газ-носитель. Загрязнение элюента может значительно повлиять на качество хроматограммы, так как большой фон может маскировать выход из колонки анализируемого соединения, особенно если оно присутствует в следовых количествах. Отсюда повышенные требования к чистоте элюента (подвижной фазы).

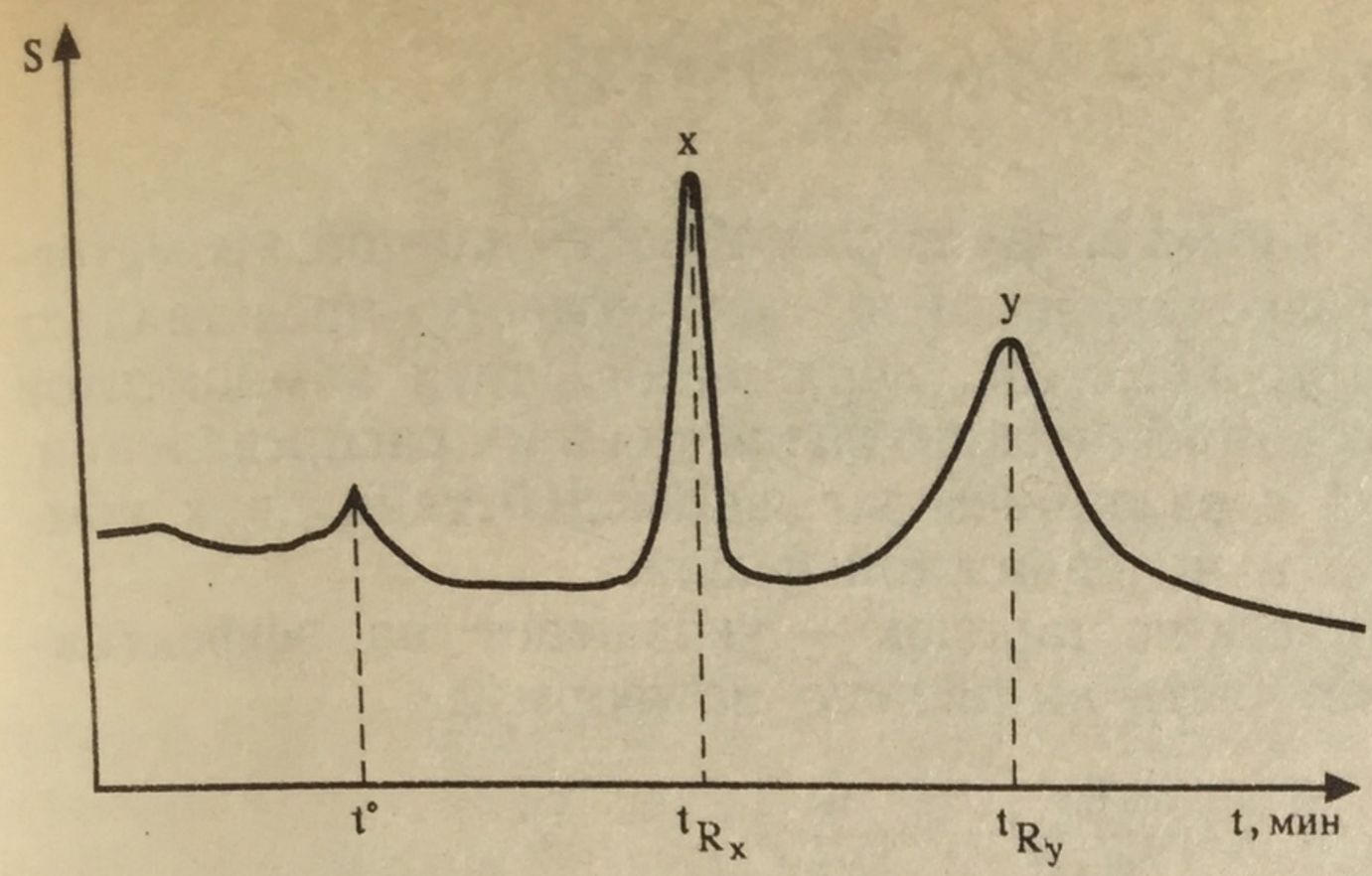


Рис. 8. Дифференциальная хроматограмма

Пик — кривая, которая описывает зависимость величины сигнала от концентрации вещества на выходе из колонки. При неполном разделении выход двух или более компонентов проявляется в виде одного неразрешенного пика. Идеальный пик представляет собой кривую Гауссова распределения (рис. 8).

Удерживание вещества в колонке характеризуется временем удерживания t_{R_i} или объемом удерживания V_{R_i}, где i — индекс, соответствующий i-му компоненту. При постоянных условиях работы и составе фаз хроматографической системы эти величины постоянны для данного вещества. Величина t_{R_i} соответствует времени появления максимума пика.

Важным параметром удерживания в хроматографии является *коэффициент емкости* k', определяемый как отношение количества вещества в неподвижной фазе к количеству вещества в подвижной фазе, т.е. коэффициент емкости определяет степень распределения образца при перемещении его через колонку. Связь удерживания вещества, длины колонки и линейной скорости подвижной фазы можно выразить зависимостью

$$t_{R_i} = \frac{L}{V}(1 + K_i').$$

Разрешение пиков (R_s) определяется расстоянием между двумя максимумами в единицах их средней ширины:

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_1 + \omega_2}.$$

Чем больше разрешение, тем лучше разделение хроматографических полос. Более длинные колонки дают лучшее разделение.

Разрешение зависит от трех основных хроматографических параметров — селективности (α), числа теоретических тарелок (эффективность колонки) (N) и коэффициента емкости (k') или коэффициента равновесного распределения k:

$$R_s = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2'}{1 + k_2'}\right)N^{1/2} .$$

Селективность α характеризует способность данной хроматографической системы разделять данную пару веществ, представляет собой отношение чистого времени удерживания двух компонентов и является мерой термодинамического различия в их распределении. Селективность связана с различием во взаимодействии двух компонентов в подвижной и неподвижной фазах.

N — число теоретических тарелок — указывает на эффективность колонки и может быть вычислено по формуле

$$N = 16\left(\frac{t_R}{\omega_{0,5}}\right)^2 = 4\left(\frac{t_R}{\omega_{2\sigma}}\right)^2 ,$$

где

$\omega_{0,5}$ — ширина пика на половине его высоты, а

$\omega_{2\sigma}$ — ширина пика на 0,607 высоты.

Удерживание компонента в колонке будет определяться особенностями его физико-химического строения. Характер ориентации молекул относительно поверхности сорбента будет зависеть от пространственной конфигурации (плоскостной или неплоскостной), экранированности или доступности полярных функциональных групп, наличия внутримолекулярных водородных связей и т.д. Все эти и другие физико-химические характеристики будут определять специфический или неспецифический тип взаимодействия вещества в хроматографической системе (табл. 29).

Таблица 29. **Типы взаимодействий адсорбент — элюент — вещество**

Адсорбент	Элюент	Разделяемое вещество	Преобладающий тип взаимодействия	
			вещество-адсорбент	вещество-элюент
Неполярный (н/п)	Неполярный (н/п)	Неполярное (н/п)	Неспецифическое (нс)	Неспецифическое (нс)
Полярный	Неполярный	Полярное	Специфическое (с)	нс
Полярный	Полярный	Полярное	с	с
Неполярный	Полярный	Неполярное	нс	нс
Неполярный	Полярный	Полярное	нс	с
Неполярный	Полярный + специальные вещества	Полярное	с + нс	с

Под специфическим взаимодействием понимают взаимодействие за счет электростатического притяжения разноименных зарядов (ионные взаимодействия) и образования водородных связей, а под неспецифическим — взаимодействия за счет сил Ван дер Ваальса, дисперсионного взаимодействия (гидрофобные взаимодействия).

ГЛАВА 10

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ТСХ-СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ

Среди многих хроматографических методов тонкослойная хроматография, предложенная в 1938 г. советскими учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбером, занимает важное место благодаря своей экспрессности, воспроизводимости, простоте и низкой стоимости анализа.

Тонкослойную хроматографию иногда называют плоскостной хроматографией, поскольку слой хроматографического сорбента имеет плоскую форму. Пластинка для тонкослойной хроматографии состоит из слоя сорбента, закрепленного на подложке. Наиболее распространенные сорбенты — оксид алюминия, силикагель, полиамид, силикагель с привитыми фазами. В качестве подложки используются разнообразные материалы — металлическая фольга, стекло, лавсановая пленка и т.д. Закрепление сорбента на подложке осуществляют с помощью гипса, крахмала, геля кремниевой кислоты. В практике обнаружения наркотических средств наиболее часто используют готовые пластинки "Силуфол", "Сорбфил", "Армсорб", пластинки ВЭТСХ, выпускаемые в Эстонии. При необходимости аналитик может приготовить пластинку сам, используя известную технику.

В наиболее распространенном варианте ТСХ-пластинка используется однократно. После разделения анализируемой смеси на отдельные компоненты хроматографирование прекращают и в хроматографических зонах проводят качественные и количественные обнаружения (детектирование). Для обнаружения бесцветных соединений чаще всего используют облучение УФ-светом, опрыскивание химическими реагентами, окунание в проявляющий раствор, капельное нанесение реагента, экстрагирование зоны вещества с сорбента для последующего исследования полученных соединений физическими и химическими методами. Идентификация компонентов проводится по свидетелям (метчикам) — известным эталонным веществам сравнения, хроматографируемым одновременно, на одной и той же пластинке, с анализируемой пробой (рис. 9).

Хроматографирование производят в хроматографической камере, причем элюирование может быть восходящим, нисходящим или горизонтальным. В качестве хроматографической камеры может быть использована герметически закрываемая емкость любой формы.

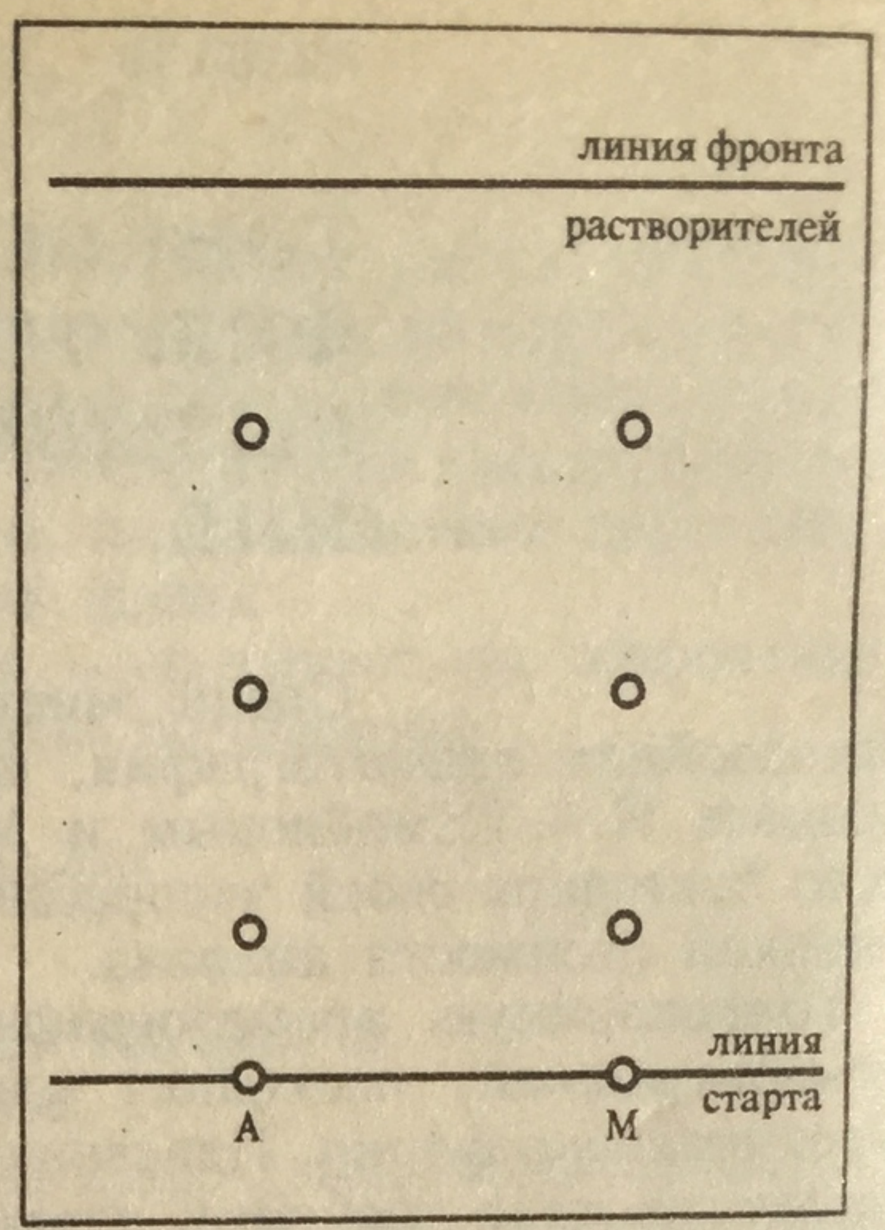
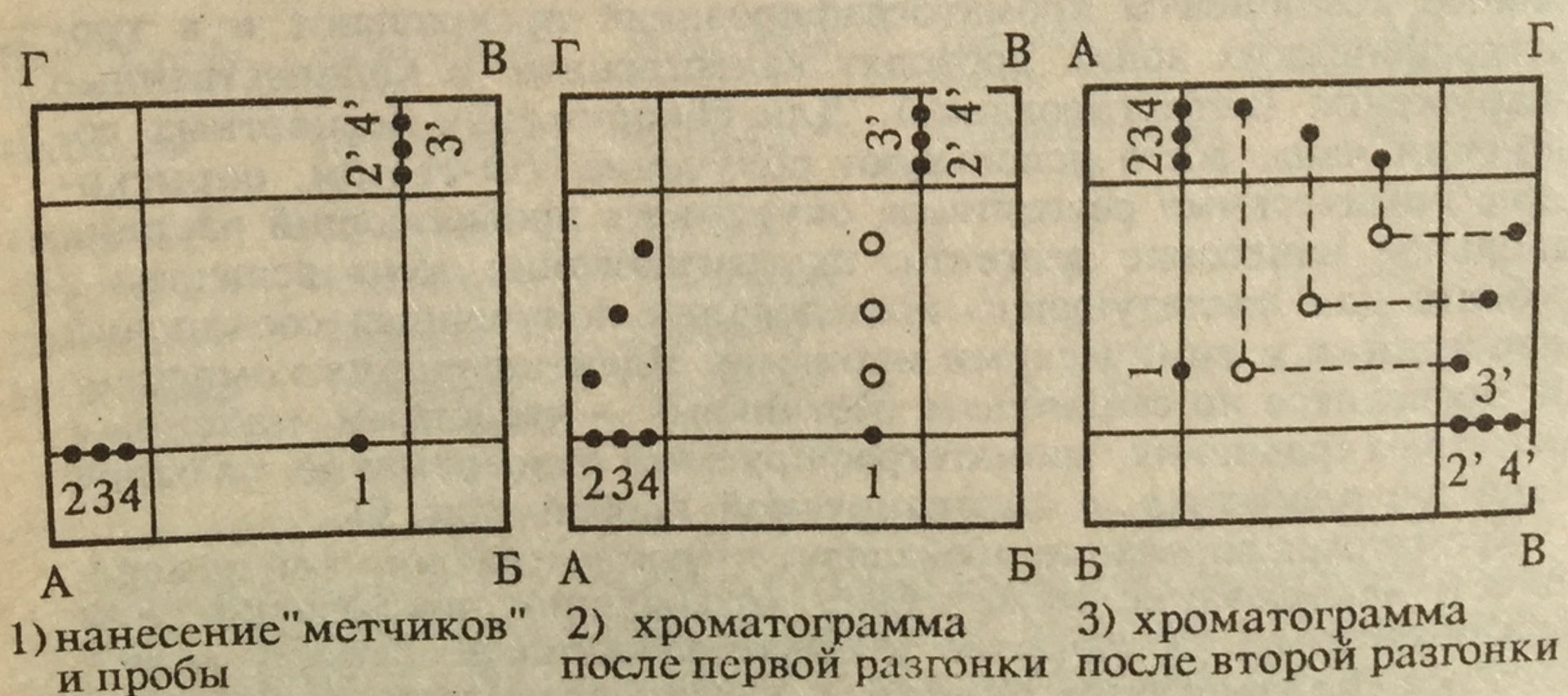


Рис. 9. Идентификация компонентов смеси с помощью метчиков

A анализируемая проба
M "метчики"

Для хроматографирования трудноразделяемых смесей, а также для повышения эффективности разделения используют такие приемы, как многомерная, круговая (и ряд других) хроматография. Круговая хроматография требует специального оборудования. Двух-, трех-, четырехмерная хроматография более простая по исполнению. Так, например, техника выполнения двухмерной хроматографии состоит в следующем: на квадратную пластинку, размеченную, как показано на рис. 10, наносят анализируемую пробу и метчики. Исследуемую пробу (экстракт из биообразца) помещают в точку



1) нанесение "метчиков" и пробы

2) хроматограмма после первой разгонки

3) хроматограмма после второй разгонки

Рис. 10. Двухмерное хроматографирование

А пластины. В точки 1, 2, 3 и 1′, 2′, 3′ наносят метчики (или пары метчиков), как и при одномерном хроматографировании.

Пластинку с нанесенной пробой и метчиками помещают в камеру с системой растворителей вначале стороной АБ, давая элюенту достичь линии фронта, не допуская перехода через линию. Далее пластину высушивают в токе воздуха, поворачивают на 90° и стороной БВ снова помещают в камеру с другой (или той же) системой и повторно хроматографируют. После достижения линии фронта пластину вынимают, высушивают и обрабатывают реагентами в той же последовательности, что и при одномерном хроматографировании.

В отличие от одномерной хроматограммы обнаруживаемые пятна пробы располагаются по диагонали БГ. Перпендикуляры проведенных от пятен метчиков, расположенных на полях, на воображаемую диагональ при наличии в точке их пересечения какого-либо пятна позволяют отождествить его (неизвестное вещество) с соответствующим эталонным веществом сравнения и рассчитать величину R_f.

Общая система для двухмерной хроматографии веществ основного характера: толуол — ацетон — этанол — аммиак (45:45:7,5: 7,5); частные системы для:

а) барбитуратов: бензол — этилацетат (2:1), хлороформ — изопропанол — аммиак (5:5:1);

б) опиатов: толуол — ацетон — метанол — аммиак (45:45:7,5: 7,5), этилацетат — этанол — аммиак (9:1:0,5);

в) эфедрина, эфедрона: метанол — аммиак (49:1), бензол — диэтиламин — этанол (9:1:1);

г) фенотиазинов: бензол — диоксан — 25%-ный аммиак (6:3,5: 0,5);

д) 1,4-бензодиазепинов: хлороформ — ацетон (9:1).

Основной качественной характеристикой тонкослойной хроматографии является величина R_f, которая представляет собой отношение расстояний, которые пройдены исследуемым веществом и подвижной фазой. Для определения R_f очень важно точно установить положение фронта растворителя.

Для того чтобы получить истинные значения R_f, необходимо выполнять следующие требования:

а) соблюдать постоянство условий вдоль пути разделения;

б) исключить возможность потерь подвижной фазы;

в) точно определять положение фронта растворителя путем измерения и расчета его действительного положения;

г) исключить случайные влияния при нанесении пробы.

На воспроизводимость значений R_f влияют два наиболее важных фактора:

1) тщательное приготовление слоев равномерной толщины (при самостоятельном изготовлении пластинки);

2) регулирование активности хроматографического слоя путем стандартизации сушки и обработки пластинки.

Чувствительность слоев кремниевой кислоты (силикагеля) сильно зависит от влажности атмосферы. Если хроматографирование проводить при относительной влажности в интервале 1 — 80%, полученные R_f могут различаться на 300%. Не рекомендуется держать пластинки слишком долго на воздухе. Пересушенные пластинки дают завышенные значения R_f, переувлажненные — заниженные.

Заметное влияние на воспроизводимость R_f оказывает степень насыщения парами растворителя атмосферы камеры, где происходит разделение, так как в ненасыщенной камере значения R_f выше.

За редкими исключениями, повышение или понижение температуры не влияет на R_f.

Влияние расстояния между уровнем растворителя в хроматографической камере и линией старта на R_f зависит от природы сорбента, природы разделяемого вещества и применяемой системы растворителей. Если разделение производится в двухкомпонентной системе, то указанное расстояние влияет на величину R_f, особенно в случаях соединений с низкими значениями R_f.

Полученные значения R_f зависят также от размеров нанесенной пробы, и степень этого влияния определяется типом разделяемых соединений.

На величину R_f оказывает влияние способ нанесения пятна. Если пробу наносят не всю сразу, а несколькими порциями в одно пятно, чтобы дать растворителю испариться, это приведет к частичному радиальному хроматографированию, что скажется на форме пятна и величине R_f. Кроме того, при нанесении пробы следует по возможности пользоваться малополярным растворителем. Примеси в пробе также влияют на величину R_f.

Существенное влияние на величину R_f оказывает природа сорбента и размер его частиц, причем для более мелких частиц имеет место тенденция к увеличению R_f.

Подводя итог сказанному, можно отметить, что величины R_f, получаемые в ТСХ, хорошо воспроизводятся, если достигается идентичность условий получения тонкослойных хроматограмм.

Идентичные условия ТСХ достигаются: 1) конструкцией и размерами камеры для разделения; 2) способом герметизации камеры; 3) условиями насыщения атмосферы камеры парами растворителя; 4) температурой опыта; 5) влажностью и относительной влажностью; 6) толщиной слоя сорбента, типом подложки; 7) связующими, флюоресцирующими веществами, буферами, веществами, используемыми для модификации сорбента; 8) методом активирования слоя; 9) устройством для нанесения пробы; 10) расстоянием от края пластинки до линии старта; 11) числом пластинок в камере; 12) продолжительностью опыта и длиной пробега; 13) составом

смеси растворителей и их чистотой; 14) размерами пятна или полосы; 15) растворителем, применяемым для нанесения пробы; 16) методом нанесения, например на открытом воздухе, в атмосфере азота и т.д.

Следует помнить, что даже при полном совпадении полученного значения с R_f известного соединения можно говорить только о *возможной* идентичности вещества, которую еще необходимо подтвердить другими методами.

По рекомендации Международного комитета по систематическому токсикологическому анализу (СТА-комитет) перед использованием приготовленной хроматографической системы необходимо провести ее апробацию с использованием образцов сравнения. И только убедившись в совпадении полученных величин R_f с табличными, можно приступить к аналитическому исследованию. В табл. 30 приведены примеры ТСХ-систем, признанных Международным СТА-комитетом в качестве стандартных.

Таблица 30. **ТСХ-системы, признанные стандартными Международным комитетом по систематическому токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов**

Система растворителей	Сорбент	Образцы сравнения	Значения R_fx100 образцов сравнения
1. Хлороформ—ацетон 80:20	Силикагель	Парацетамол	15
		Клоназепам	35
		Секобарбитал	55
		Метилфенобарбитал	70
2. Этилацетат	»	Сульфатиазол	20
		Фенацетин	38
		Салициламид	55
		Секобарбитал	68
3. Хлороформ—метанол 90:10	»	Гипотиазид	11
		Сульфафуразол	33
		Фенацетин	52
		Празепам	72
4а. Этилацетат—метанол концентрированный 80:10:5 (для кислых и нейтральных)	»	Сульфадимезин	13
		Гипотиазид	34
		Темазепам	63
		Паразепам	81
4б. Этилацетат—метанол концентрированный 85:10:5 (для основных)	»	Морфин	20
		Кодеин	35
		Гидроксизин	53
		Тримипрамин	80
5. Метанол	»	Кодеин	20
		Тримипрамин	36
		Гидроксимин	56
		Диазепам	82
6. Метанол-н-бутанол 60:40	»	Кодеин	22
		Дифенгидрамин	48
		Хинин	65
		Диазепам	85

7. Метанол концентрированный 100:1,5	Силикагель, импрегнированный 0,1 М КОН и высушенный	Атропин	18
		Кодеин	33
		Хлорпротиксен	50
		Диазепам	75
8. Циклогексан—толуол—диэтиламин 75:15:10	То же	Кодеин	6
		Дезипрамин	20
		Празепам	36
		Тримипрамин	62
9. Хлороформ—метанол 90:10	»	Дезипрамин	11
		Физостиглин	36
		Тримипрамин	54
		Лидокаин	71
10. Ацетон	»	Амитриптилин	15
		Прокаин	30
		Папаверин	47
		Цинназирин	65

Примечания:

1. Растворители в системах смешиваются в объемных отношениях. Во всех системах, кроме 5 и 6, используются насыщенные камеры.
2. Растворы образцов сравнения готовятся в концентрациях около 2 мг/мл каждого.

Выбор наилучшей системы для конкретной задачи зависит от поставленной цели исследования. Например, если необходимо разделить большое число компонентов, т.е. применить скрининг, рекомендуется использовать три главных системы. Во-первых, система должна дать хорошее распределение пятен по всей пластинке для наиболее важных веществ. Во-вторых, значения R_f должны быть воспроизводимы. И наконец, обязательной должна быть их низкая корреляция между различными системами.

Для оценки способности ТСХ-систем решать конкретную задачу частного разделения привлекают математический аппарат, и в частности расчет "дискриминирующей силы" (DP):

$$DP = 1 - \frac{2M}{N(N-1)},$$

где M — общее число экспериментов, N — общее число определяемых соединений.

В общем скрининге токсических соединений системы 7, 8, 9 рекомендованы в качестве общих для обнаружения веществ основного характера, а системы 1, 4а, 2 — для обнаружения веществ кислого характера. В ТСХ-скрининге не может быть одной лучшей системы для частного разделения, однако каждая из представленных систем может быть выбрана в качестве основной, если она дает хорошее распределение значений R_f, воспроизводима и имеет низкую корреляцию с другими выбранными системами для этой группы веществ.

В скрининге веществ основного характера используются следующие реагенты для обнаружения:

а) раствор нингидрина; пластинку опрыскивают реагентом, затем 5 минут нагревают при 100°С. Первичные амины дают пятна фиолетового или чернильного цвета, вторичные — желтого цвета;

б) FPN-реагент; фенотиазины дают красные или красно-коричневые пятна, дибензазепины — голубые. Реагент можно нанести опрыскиванием на пластинку, которая уже была обработана нингидрином;

в) реактив Драгендорфа; желтые, оранжевые, красно-оранжевые или красно-коричневые пятна свидетельствуют о наличии алкалоидов, содержащих третичный атом азота. Реагент наносится опрыскиванием и может быть нанесен на пластинку, обработанную нингидрином и FPN-реагентом;

г) раствор подкисленного йодплатината; фиолетовые, сине-фиолетовые, серо-фиолетовые и коричнево-фиолетовые пятна характерны для третичных аминов и четвертичных аммонийных оснований. Этот реагент можно нанести опрыскиванием на пластинку, обработанную тремя предыдущими реагентами *;

д) реактив Манделина. Этот реактив наносится на пластинку капельно, так как в его состав входит концентрированная кислота (опасность разбрызгивания). Со многими соединениями дает разнообразные окраски. Неспецифичен;

е) реактив Марки. Этот реактив наносится капельно. Алкалоиды группы опия дают черные или фиолетовые пятна. Другие соединения также дают различные окраски.

Для веществ кислого характера используются следующие реагенты:

а) раствор хлорида железа (III). Вещества, содержащие фенольный гидроксил, дают голубые и фиолетовые пятна;

б) нитрат ртути. Барбитураты дают темные пятна, медленно блекнущие. При опрыскивании разбавленным раствором пятна блекнут быстрее.

Для обнаружения веществ нейтрального характера используют:

а) фурфурол. Фиолетовые или черно-голубые пятна дают некоторые соединения нейтрального характера, например карбаматы;

б) раствор подкисленного йодплатината может быть нанесен опрыскиванием на пластинку, обработанную предыдущим реагентом.

При отсутствии метчиков на конкретное соединение, а также для объективизации полученных результатов полезно использовать величину R_s, которая представляет собой отношение величины R_f вещества в конкретной системе к величине R_f вещества, принятого за стандарт. В табл. 31 приведены сравнительные данные значений R_f и R_s для субстанций веществ кислого и основного характера, полученные на пластинах "Силуфол" и ВЭТСХ.

* При использовании пластинок "Силуфол" и других, где сорбент закреплен на подложке с помощью крахмала, последовательность опрыскивания заканчивается до употребления реактива Драгендорфа и йодплатината.

Таблица 31. Значение R_s одурманивающих средств основного характера относительно аминазина на пластинках "Силуфол" и ВЭТСХ

Лекарственное соединение	"Силуфол"			ВЭТСХ				
	УФ			реактив Марки	УФ	реактив Драгендорфа	R_f	R_s
	R_s	254 нм	366 нм					
Аминазин	1,0			2 розовых пятна	красное	оранж.	0,77	1,00
Атропин	0,2	+			голуб.	оранж.	0,17	0,22
Дионин	0,41	+		грязно-фиол.	слабое свечение	оранж.	0,43	0,56
Димедрол	0,95	+ розов.	+	желтое		буро-оранж.	0,77	1,00
Папаверин	1,21	розов. ++			слабое	оранж.	0,8	1,04
Морфин	0,19	+	—			оранж.	0,12	0,14
Кодеин	0,37			сиреневое	++	оранж.	0,42	0,49
Эфедрин	0,24					оранж.	0,2	0,24
Промедол	1,01					оранж.	0,8	0,94
Нитразепам	1,02	зел.	+—		голуб.			
Диазепам	1,27		2 пятна +—		голуб.	оранж.	0,78	1,04
Хлозепид	0,84		2 пятна +—		голуб.		0,5	0,67
Оксазепам		+			2 пятна голуб.		0,43	0,57
Хлорпротиксен	1,08	голуб. ++		оранж.	ярко-оранж.	оранж.	0,77	1,05
Трифтазин	0,66	++—		желто-оранж.	синее		0,65	0,87
Тизерцин	1,16	фиол. + —		синее 2 пятна	фиол.	синее	0,8	1,1
Тиоридазин	0,96	фиол.	фиол.	зеленое, розовое	фиол.	зеленое	0,73	0,97

Примечание. Пластинка ВЭТСХ разм. 6,5x10 см. Система: диоксан — хлороформ — ацетон — 25%-ный аммиак (47,5:45:5:2,5). Длина пробега — 60 мм.

Таблица 32. **Значения R_f и R_s одурманивающих средств при хроматографировании на силуфоле УФ-254 в системе растворителей бензол:диоксан:25%-ный аммиак (60:35:5)**

Лекарственное соединение	R_f	R_s
Аминазин	0,35	1,00
Барбамил*	0,53	1,44
Барбитал*	0,44	1,19
Галлоперидол	0,58	1,66
Димедрол	0,30	0,84
Дионин	0,04	0,11
Кодеин	0,04	0,11
Кокаин	0,63	1,80
Морфин	0,00	—
Наркотин	0,58	1,66
Папаверин	0,90	2,56
Промедол	0,28	0,76
Триседил	0,37	1,06
Тизерцин	0,53	1,52
Фенобарбитал*	0,36	0,96
Эфедрин*	0,03	0,09
Эфедрон*	0,16	0,43

Примечание. Значения R_s рассчитывались по аминазину;
* — для данных соединений значения R_f аминазина = 0,40.

Таблица 33. **Сравнительные значения R_f средств, вызывающих одурманивание, полученных на пластинках "Сорбфил" и ВЭТСХ**

Анализируемые вещества	Сорбфил		ВЭТСХ	
	Система растворителей	R_f	Система растворителей	R_f
1	2	3	4	5
ВЕЩЕСТВА КИСЛОГО И НЕЙТРАЛЬНОГО ХАРАКТЕРА				
А. Барбитураты	Хлороформ—изопропанол—25%-ный аммиак (4,5:4,5:0,5)		Хлороформ—изопропанол—25%-ный аммиак (4,5:4,5:0,5)	
Барбитал		0,52		0,75
Фенобарбитал		0,39		0,30
Этаминал натрия		0,80		0,65
Барбамил		0,75		0,60
Бутабарбитал		0,65		0,55
Б. Производные 1,4-бензодиазепина (продукты гидролиза — бензофеноны)	Бензол—этанол—диэтиламин (9,5:0,5:0,2)		Бензол—этанол—диэтиламин (9,5:0,5:0,2)	
2-амино-5-хлорбензофенон (АХБ)		0,61		0,72
2-амино-5-нитробензофенон (АНБ)		0,46		0,65
2-метиламино-5-хлорбензофенон (МХБ)		0,73		0,83

1	2	3	4	5
В. Каннабиноиды			Петролейный эфир—диэтиловый эфир (9:1)	
Δ8 — ТГК				0,72
Δ9 — ТГК				0,60
Каннабидиол				0,56
Каннабинол				0,50
ВЕЩЕСТВА ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА				
А. Алкалоиды опия	Этилацетат —		Этилацетат —	
Морфин	этанол —	0,2	этанол —	0,17
Кодеин	25%-ный аммиак (9:1:0,5)	0,34	25%-ный аммиак (9:1:0,5)	0,40
Б. Промедол	»	0,69		0,75
В. Димедрол	»	0,73		0,80
Г. Метадон	Бензол—этанол—диэтиламин (9:1:1)	0,80	Бензол—этанол—диэтиламин (9:1:1)	0,86
Д. Фенилалкиламины	Бензол—этанол—диэтиламин (9:1:1)		Бензол—этанол—диэтиламин (9:1:1)	
Эфедрин		0,41		0,50
Эфедрон		0,65		0,80
Первитин		0,42	Этилацетат—этанол—25%-ный аммиак (9:1:0,5)	0,54
Е. Фенатиазины	Этилацетат—этанол—аммиак (9:1:0,5)			
Аминазин		0,72		0,77
Дипразин		0,66		0,74
Тиоридазин		0,70		0,72
Тизерцин		0,75		0,82

10.1. ТСХ-АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО НАРКОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

Растение мак и опий-сырец. Для исследований могут быть представлены куски растения и солома мака, измельченные головки мака и отвары (настои), полученные из них, опий, полученный из растения экстракционным путем. Основная цель исследования — установление наличия в представленных образцах наркотических алкалоидов — морфина, кодеина, тебаина.

Если объектом исследования служат коробочки мака, их измельчают, удаляя предварительно семена. Далее их сушат при 60— 70°С в течение 5 часов и измельчают. Аналогичную подготовку (сушка и измельчение) осуществляют и с маковой соломой.

В случае опия-сырца и экстракционного опия образцы вначале замораживают, а затем быстро измельчают в фарфоровой ступке. Если образцы влажные, их предварительно высушивают при 60 — 70°С в течение 24 часов. Отвары (настои) можно непосредственно

наносить на пластинку, предварительно профильтровав их. Для анализа растительного сырья образцы (100 мг) заливают 1 мл смеси этанола — хлороформа (1:2) или метанолом, содержащим 0,1% триэтиламина или 25% водного аммиака, и нагревают до начала кипения на кипящей водяной бане. Полученный экстракт фильтруют и наносят на хроматографическую пластинку. Хроматографирование — в системе этилацетат — этанол — 25%-ный аммиак (9:1:0,5), обнаружение — с помощью реактива Марки.

Конопля и гашиш. В качестве вещественных доказательств могут фигурировать различные части растения конопли, ее метелки, мякина, гашиш и гашишное масло. Кроме того, при установлении факта употребления на исследование могут быть доставлены слюна, смывы с полости рта и с поверхности пальцев обследуемого.

При исследовании растительного сырья поступают следующим образом: от верхушечных частей конопли отделяют листья и соцветия и перетирают их в фарфоровой чашке или через сито (диаметр ячейки не более 0,25 мм). 100 мг полученной массы заливают одним миллилитром этанола и осторожно нагревают на кипящей водяной бане (до начала кипения спирта). Полученный экстракт отделяют от осадка и наносят на ТСХ-пластинку для исследования.

После двукратного разделения в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (9:1) пластинку сушат 10 — 20 минут при комнатной температуре, изучают в УФ-свете, а затем опрыскивают раствором Прочного Синего Б (или ББ). Объект относится к гашишу либо сырью для его получения, если в нем выявлены Δ^9-тетрагидроканнабинол и(или) Δ^8-тетрагидроканнабинол.

10.2. ТСХ-АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

10.2.1. Предварительное исследование биожидкостей

FPN-тест на производные фенотиазина. 2 мл мочи смешивают с 1 мл реактива FPN (смесь 5 частей 5%-ного раствора хлорида железа (III), 45 частей 20%-ного раствора хлорной кислоты и 50 частей 50%-ного раствора азотной кислоты). При наличии производных фенотиазина наблюдается красное, розовое, голубое или красно-фиолетовое окрашивание в зависимости от структуры и количества соединений в исследуемой пробе. Проба с реактивом FPN не специфична и имеет только судебно-отрицательное значение. При отрицательном результате пробы дальнейшего исследования мочи на наличие производных фенотиазина не проводится. При положительном результате проводится исследование по частотной методике (см. ниже).

Тест на присутствие эфедрина и эфедрона в моче. Предел обнаружения 1 мкг/мл для эфедрона и 0,5 мкг/мл для эфедрина.

К 1 мл мочи добавляют кристаллический сульфат натрия до насыщения (кристаллы, выпавшие в осадок, не растворяются при встряхивании в течение 30 секунд) и затем по 0,5 мл сероуглерода в бензоле (5%-ный раствор) и аммиаката меди. Встряхивать 30 минут. В этих условиях эфедрин и эфедрон образуют комплексное соединение с медью, содержащееся в верхнем органическом слое. Органическую фазу отбирают, а водную промывают 1 мл бензола. Объединенные органические экстракты упаривают в токе холодного воздуха до объема 50 — 100 мкл. Упаренный экстракт количественно наносят полосой 3 см на линию старта пластинки "Силуфол — УФ-254". В качестве метчиков используют комплекс эфедрина и эфедрона с медью в концентрации 1 мг/мл, приготовленный из чистых субстанций по следующей методике.

Приготовление метчиков. К 1 мл водного раствора эфедрина и эфедрона добавляют кристаллический сульфат натрия до насыщения, а затем 5%-ный раствор сероуглерода в бензоле и аммиакат меди, каждого по 0,5 мл. Смесь встряхивают 30 минут, отбирают органическую фазу, а водную промывают 1 мл бензола. Органические экстракты объединяют. Объем метчика, наносимого на пластинку, — 1 мкл.

Приготовление аммиаката меди. Раствор А — растворить 20 г ацетата аммония и 0,5 г сульфата меди в 30 мл воды. Раствор Б — 10 г едкого натра растворить в 20 мл воды и добавить 20 мл 25%-ного раствора аммиака.

Прибавить к раствору А раствор Б и довести общий объем дистиллированной водой до 100 мл.

Хроматографирование производят в системе хлороформ — ацетон (48:2) для эфедрина и в системе циклогексан — ацетон — метанол (40:10:2) для эфедрона. R_f для эфедрина — 0,26, для эфедрона — 0,27. Длина пробега растворителя — 10 и 15 см соответственно. Пластинку просушивают и просматривают в УФ-свете. Желто-коричневое окрашивание и совпадение величин R_f с метчиками служат положительной реакцией и основанием для проведения дополнительного исследования.

При отрицательном результате на эфедрин и эфедрон (и того и другого) дальнейшего исследования на их обнаружение не проводится.

10.2.2. ТСХ-скрининг мочи

Изолирование (схема 24). 50 мл мочи в делительной воронке на 200 мл подкисляют 2 н соляной кислотой до pH=1 — 2 по универсальному индикатору. И после добавления 50 мл диэтилового эфира проводят экстракцию в течение 3 — 5 минут (перемешивая фазы без энергичного встряхивания). После разделения фаз нижнюю водяную фазу сливают в другую делительную воронку, содержащую 50 мл эфира, а органическую фазу фильтруют через

Изолирование определяемых соединений (жидкость — жидкостная экстракция) из мочи

моча (50 мл) pH=1-2 → экстракция диэтиловым эфиром (50 мл дважды)

водная фаза (pH=9) ↔ органическая фаза

водная фаза (pH=9) → экстракция смесью хлороформа-н-бутанола (9:1) (50 мл дважды) → органическая фаза → упаривание → остаток → растворение в 10мл хлороформа → экстракт 2 (вещества основного характера)

органическая фаза → упаривание → остаток → растворение в 10 мл хлороформа → экстракт 1 (вещества кислого, нейтрального и слабо-основного характера)

Схема 24

безводный сульфат натрия в сухой стакан. Повторную экстракцию из водной фазы проводят аналогично. Эфирное извлечение фильтруют через безводный сульфат натрия и обе эфирные вытяжки объединяют (экстракт 1). Водную фазу сохраняют, переносят ее в делительную воронку, доводят pH до 9 добавлением 10%-ного раствора аммиака и проводят экстракцию 50 мл смеси хлороформ — н-бутанол (9:1) в течение 3 — 5 минут. Затем нижнюю органическую фазу сливают, фильтруя через безводный сульфат натрия в сухой стакан. Водную фазу повторно экстрагируют 50 мл той же смеси. Органические фазы объединяют (экстракт 2). Водную фазу отбрасывают. Органические растворители из экстрактов 1 и 2 удаляют в испарительных чашках (на 50 мл каждая) в токе теплого воздуха, добавляя экстракты порциями.

Сухие остатки экстрактов 1 и 2 растворяют в 10 мл хлороформа (каждый) и переносят в маркированную пробирку (экстракт 1 и экстракт 2) с притертыми пробками (*избегать* применения резиновых пробок!).

Хроматографическое обнаружение проводится с использованием следующих материалов и систем растворителей:

а) хроматографические пластинки:

"Силуфол УФ-254", "Сорбфил" или ВЭТСХ;

б) системы растворителей:

1. Хлороформ — ацетон (9:1).

2. Диоксан — хлороформ — ацетон — 25%-ный раствор аммиака (47,5:45:5:2,5).

3. Бензол — диоксан — 25%-ный раствор аммиака (60:35:5).

4. Этилацетат — ацетон — (этанол — 25%-ный раствор аммиака 1:1) в соотношении 50:45:4.

Вещества кислотного, нейтрального и слабоосновного характера

Схема 25

1а — на производные 1,4-бензодиазепина (гидролиз и обнаружение по аминобензофенонам), "Силуфол", система 6.
1б — на производные барбитуровой кислоты, "Силуфол", система 1.
1в — на производные барбитуровой кислоты, "Силуфол", система 5.
1г — используется по необходимости.

Вещества основного характера

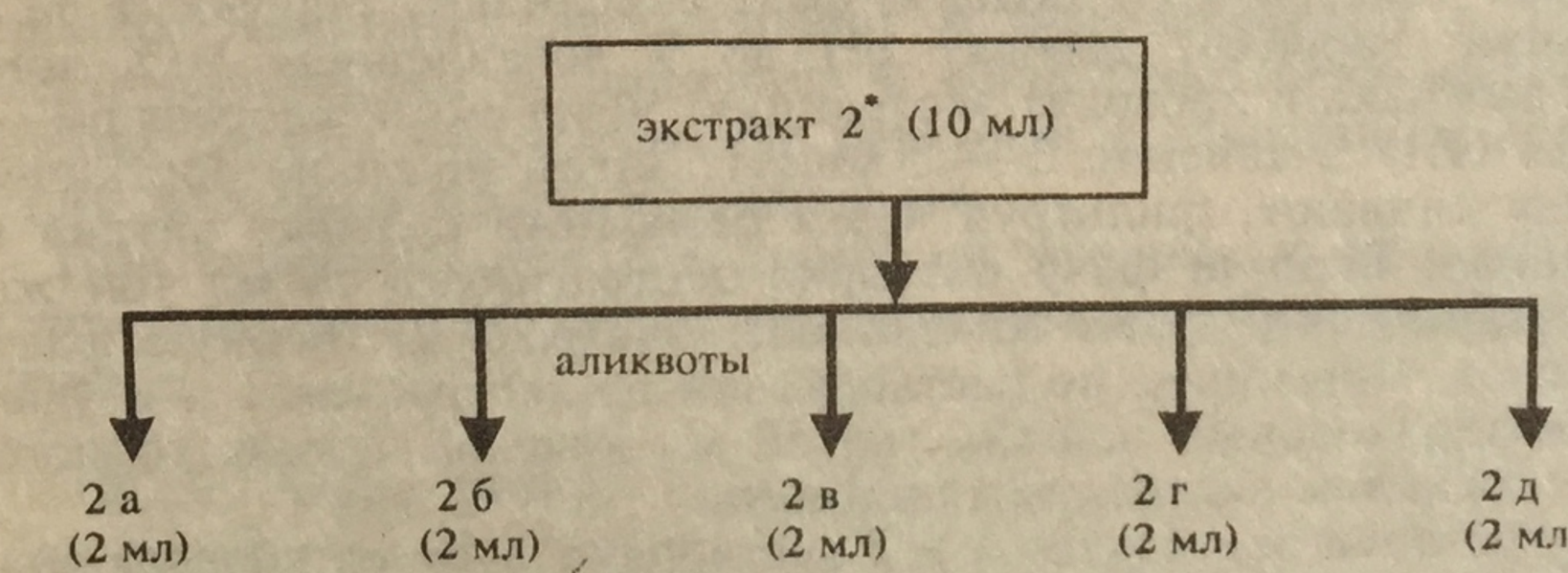


Схема 26

Распределение аликвот (пример)
2а — производные 1,4-бензодиазепина (объединенное с 1а).
2б — вещества основного характера.
2в — ВЭТСХ-пластинки, системы 2 и 5.
2г — вещества основного характера.
2д — "Силуфол",системы 5 и 2.

5. Толуол — ацетон — этанол — 25%-ный раствор аммиака (45:45:7,5: 2,5).
6. Бензол.
7. Метанол — 25%-ный раствор аммиака (100:1,5).

10.2.3. Распределение аликвот экстрактов для исследования
10.2.4. Хроматографическое исследование

А. Вещества кислотного, нейтрального и слабоосновного характера

Производные 1,4-бензодиазепина. Аликвоты 1а и 2а (см. схемы 25 и 26) в мерной пробирке на 10 — 15 мл или колбе упаривают досуха на кипящей водяной бане. К остатку добавляют 5 мл 6 н HCl и содержимое нагревают в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане 60 минут. Гидролизат охлаждают, нейтрализуют насыщенным раствором NaOH до pH=7— 9. Полученный раствор переносят в делительную воронку и продукты гидролиза производных 1,4-бензодиазепина — соответствующие аминобензофеноны экстрагируют равным объемом хлороформа. Нижнюю органическую фазу отделяют, фильтруя через безводный сульфат натрия; хлороформ упаривают в токе теплого воздуха приблизительно до объема 0,2 мл, который количественно переносят на стартовую линию пластинок "Силуфол". Хроматографирование проводят в системе бензол. Обнаружение — по собственной окраске, свечению в УФ-области и реакции Браттона — Маршалла.

Производные барбитуровой кислоты. Аликвоты 1б и 1в упаривают раздельно досуха. Остатки растворяют приблизительно в 0,2 мл хлороформа и наносят каждый раствор на отдельную пластинку "Силуфол". В качестве метчиков используют спиртовые растворы барбитала, барбамила и ноксирона (наносятся раздельно). Пластинку с аликвотой 1б хроматографируют в системе 1:хлороформ — ацетон (9:1), с аликвотой 1в — в системе 5:толуол — ацетон — этанол — 25%-ный аммиак (45:45:7,5:2,5). Длина пробега — 10 см. Обнаружение — обе пластинки опрыскивают сначала раствором сульфата ртути, затем раствором дифенилкарбазона в хлороформе (избегая его избытка).

Барбитураты и ноксирон обнаруживают в виде сине-фиолетовых или красных пятен на исчезающем сиреневом фоне. Значение величин R_f метчиков охватывает весь интервал значений Rf производных барбитуровой кислоты и ноксирона.

Б. Вещества основного характера

1. Исследование на высокоэффективных пластинках (ВЭТСХ)

На каждую из двух хроматографических пластинок 6,5 × 10 см наносят по половине аликвоты 2б и 2в в виде полос длиной 1 см. В качестве метчиков на каждую пластинку помещают стандартные растворы (1 мг/мл) морфина, промедола, кокаина и кодеина (1-я точка) в количестве 10 — 20 мкл и аминазина (2-я точка). Одну пластинку хроматографируют в системе 2, другую — в системе 5. Длина пробега — 5 — 6 см.

Идентификация. Часть пластинки, соответствующая одной аликвоте (одна полоса), закрывается стеклянной пластинкой. Остальная часть пластинки (аликвота и метчики) обрабатывается реактивами в следующей последовательности: серная кислота в этаноле (1:9) — обнаруживаются производные фенотиазина; затем реактивом Драгендорфа обнаруживаются все вещества основного характера (оранжево-коричневые пятна).

В зоне, не обработанной реагентами, проводят обнаружение наркотических алкалоидов и промедола путем нанесения реактива Марки капельно в зоне, параллельной метчикам и пятнам, отмеченным в исследуемой аликвоте, обработанной реактивом Драгендорфа (соответствующим наркотическим алкалоидам и промедолу).

В случае проявления пятен после обработки реактивом Драгендорфа с относительной величиной R_f, соответствующей амитриптилину и димедролу, в необработанной зоне параллельно данным пятнам наносят капли концентрированной серной кислоты. При наличии димедрола появляется желтое окрашивание, в случае амитриптилина оранжевое окрашивание обнаруживается после нагревания (в сушильном шкафу при 60 — 70°С).

2. Исследование на пластинках "Силуфол УФ-254"

На две пластинки "Силуфол" размером 15 × 15 см наносят аликвоты 2г и 2д аналогично нанесению на пластинки ВЭТСХ. В качестве метчиков используют стандартные растворы (1 мг/мл) морфина, промедола, кокаина (1-я точка), кодеина, аминазина (2-я точка), димедрола (3-я точка), папаверина (4-я точка), амитриптилина (5-я точка). Одну пластинку хроматографируют в системе 2, другую — в системе 5. Выбор системы зависит от результата исследования на ВЭТСХ-пластинках. Система 2 может быть заменена системой 7. Длина пробега — 10 см.

Обнаружение. Пластинки рассматривают в УФ-свете при 254 нм, и отмечают карандашом в исследуемых зонах пятна обнаруженных веществ и пятна метчиков. Затем в зоне метчика и параллельно в анализируемые зоны с помощью капилляра наносят: для обнаружения фенотиазинов — раствор серной кислоты в этаноле (1:9), опиатов — реактив Марки, димедрола — концентрированную серную кислоту, амитриптилина — концентрированную серную кислоту (пластинку нагреть!).

Хроматографирование на двух разных сорбентах, в двух отличающихся по полярности системах позволяет достаточно надежно провести групповое, а в ряде случаев — частное (т.е. индивидуальное) обнаружение исследуемых лекарственных соединений.

При необходимости подтверждения природы вещества, т.е. более точного установления его структуры, а также при исследовании на морфин следует обратиться к более чувствительным методам.

Посуда и реагенты. Приготовление реагентов

а) Реагенты

1. Реактив Драгендорфа модифицированный.

Раствор 1. 0,85 г нитрата висмута основного растворяют в 40 мл воды и 10 мл уксусной кислоты.

Раствор 2. 8 г йодида калия растворяют в 20 мл воды.

Смешивают равные объемы растворов 1 и 2. К 10 мл полученной смеси добавляют 100 мл воды и 20 мл уксусной кислоты (хранить в темном месте).

2. Реактив Марки.

К 1 мл концентрированной серной кислоты добавляют одну каплю формалина и охлаждают.

3. Реактив Фреде.

Насыщенный раствор молибденовокислого аммония в серной кислоте.

4. Сернокислая ртуть ($HgSO_4$).

1) К 5,0 г оксида ртути (II) прибавляют 100 мл дистиллированной воды и 20 мл концентрированной серной кислоты. Полученный раствор охлаждают и доводят водой до 250 мл.

2) К 6,86 г сульфата ртути (II) прибавляют 20 мл концентрированной серной кислоты и 100 мл дистиллированной воды. Полученный раствор охлаждают и доводят водой до 250 мл.

5. Дифенилкарбазон — 0,02%-ный раствор в хлороформе.

6. Реактив FNP.

5 частей 5%-ного раствора хлорида окисного железа, 45 частей 20%-ного раствора хлорной кислоты и 50 г 50%-ного раствора азотной кислоты.

7. N-α-нафтилэтилендиамин — 0,1%-ный водный раствор.

8. β-нафтол.

2 г β-нафтола растворяют в 40 мл 10%-ного раствора едкого натра и доводят объем водой до 100 мл. Раствор должен быть свежеприготовленным.

9. Раствор этанола в серной кислоте.

9 объемных частей этанола и 1 объемная часть концентрированной серной кислоты.

10. Приготовление систем растворителей.

При приготовлении систем 2 и 3 после смешивания растворителей (по объему) смесь необходимо энергично встряхивать в течение 3 — 5 минут. Мутную жидкость сливают в камеру, проложенную (по боковым стенкам и дну) фильтровальной бумагой.

Не допускать расслоения системы!

б) Посуда

1. Хроматографические камеры.
2. Пульверизаторы.
3. Пробирки мерные на 10, 15 мл с нш 14,5.
4. Капельницы.
5. Пипетки глазные.
6. Пастеровские пипетки.
7. Стеклянные палочки.
8. Делительные воронки на 150 — 200 мл.
9. Стаканы химические на 100 и 250 мл.

10. Чашки фарфоровые.
11. Бюксы (высота — 3 — 5 см, диаметр — 6 — 8 см).
12. Колбы на 200 — 250 мл с нш 29.
13. Капилляры.
14. Воронки (диаметр — 3 — 5 и 5 — 10 см).
15. Цилиндры на 10, 50, 100 и 200 мл.
16. Пипетки мерные на 1, 2, 5 и 10 мл.

ГЛАВА 11

ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) является, пожалуй, самым распространенным методом анализа токсических соединений. Метод хорошо оформлен теоретически и аппаратурно. Имеется масса разнообразной справочной литературы, где химик-токсиколог всегда найдет необходимую ему информацию. В Российской Федерации выпускаются газовые хроматографы различных типов — ЛХМ, "Цвет", "Кристалл", "Агат" и др.

Газожидкостная хроматография использует богатый арсенал колонок как по исполнению — металлические, стеклянные, капиллярные, так и по используемым носителям и жидким неподвижным фазам. Широкий выбор детекторов (по теплопроводности, пламенно-ионизационный, по электронному захвату, фотоионизационный, масс-спектрометрический и др.) позволяет решать самые разнообразные задачи, стоящие перед токсикологом.

К применяемым в ГЖХ наполнителям колонок предъявляется целый ряд требований. Так, например, носитель должен обладать большой удельной поверхностью, химической инертностью, механической прочностью, однородностью размеров частиц, пористой структурой, термостойкостью. Чаще всего в качестве носителя используются силанизированные диатомитовые земли, полимерные сорбенты— "хромосорбы", "порапаки", "полисорбы" и т.д.

Жидкая неподвижная фаза должна обладать химической стойкостью, низким давлением пара при температурах колонки, достаточным коэффициентом разделения, достаточной селективностью по отношению к разделяемым компонентам пробы, низкой вязкостью, растворимостью в каком-либо летучем растворителе. В классификации неподвижных фаз используется понятие полярности. Чем больше полярность жидкой фазы, тем больше удерживание полярного растворенного вещества. Существуют специальные таблицы, в которых содержатся сведения о полярности подвижных фаз.

Среди неполярных фаз наиболее распространенными являются Апиезоны L, M, N, SE-30, OV-1 и OV-101. Апиезон L по своей природе — углеводород и используется в анализе барбитуратов, спиртов, углеводородов, алкалоидов, азотсодержащих соединений, а SE-30, OV-1 и OV-101 — полимеры диметилсилана; SE-30 применяется в качестве неподвижной фазы для капиллярных колонок; OV-1 предпочитают при работе с колонками при температуре выше 350°С.

Самыми распространенными полярными фазами являются Карбовакс-20М (полиэтиленгликоль с молярной массой 20 000), применяемый для разделения алкалоидов и других веществ основного характера, OV-17 (фенилметилсилан), XE-60 (цианоэтилсилан), полиэфиры, применяемые при анализе эфиров жирных кислот, полиамиды, используемые для разделения третичных аминов, трициклических депрессантов.

Г Ж Х-скрининг. В направленном химико-токсикологическом анализе, т.е. исследовании на известный яд, всегда можно подобрать оптимальные условия ГЖХ-анализа с помощью справочной литературы.

При исследовании на неизвестный яд необходимо использовать скрининговый поиск. Для этого проводят сначала ГЖХ-анализ в общей системе, а затем находят подтверждение в частных системах.

Газовая хроматография накапливает данные о временах удерживания или индексах удерживания (RI) веществ, которые могут быть использованы для их идентификации, а размер сигнала или пика служит для определения количества вещества. Сравнение RI неизвестного соединения с RI известных соединений составляет основу идентификации.

Международный комитет по систематическому токсикологическому анализу, проведя работу по межлабораторному сравнению используемых систем колонок и полученных индексов удерживания, отобрал оптимальные системы на основе их разделительной способности и воспроизводимости. Так, Комитет рекомендовал SE-30 и OV-1 как предпочтительные фазы для ГЖХ органических соединений со средней или низкой летучестью (важные соединения с точки зрения токсикологии).

Перед началом ГЖХ-анализа или проведения работы по получению индексов удерживания наркотических веществ необходимо проконтролировать хроматографическую систему с помощью тестовой смеси для проверки качества колонки, эффективности разделения и чувствительности детектирования. Для этой цели может быть рекомендована следующая система:

Материал колонки — хромосорб G (80 — 100 меш).

Покрытие — SE-30 или OV-1, 1,3%.

Температура: 200 — 280°С (программированная).

Тестовая смесь "А" — метанольный раствор каждого из следующих веществ в концентрации 100 мг/л (в скобках указана величина индекса удерживания): барбитал (1497), этаминал натрия (1740), дифенгидрамин (1873), фенобарбитал (1957), метаквалон (2125), кодеин (2376), морфин (2455), налорфин (2577), хинин (2803), галоперидол (2942), стрихнин (3119).

Эта тестовая смесь охватывает широкую область значений RI наркотиков. После инжектирования 1 мкл всех соединений (150 нг каждого) должно наблюдаться детектирование соединений тестовой смеси (детектор ПИД) и хорошее разделение соединений с доста-

точно четкими пиками. Тестовая смесь стабильна в течение 2 месяцев при хранении в холодильнике (4°С). Раствор этих же соединений с концентрацией 1 г/л в метаноле стабилен в течение 2 лет (в холодильнике).

11.1. ВЫЧИСЛЕНИЕ ИНДЕКСОВ УДЕРЖИВАНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ НА ПРАКТИКЕ

В газовой хроматографии важнейший измеряемый параметр — это время, в течение которого соединение удерживается в разделительной системе. Оно определяется процессами сорбции и распределения в колонке и зависит от многих факторов, таких, например, как состав стационарной фазы, состав газа-носителя, длина колонки, ее температура, удерживаемый объем. В токсикологическом анализе помимо измерения времени удерживания, или чистого времени удерживания, необходимо получение таких данных, как воспроизводимость и сходимость.

Эта проблема может быть решена определением относительного времени удерживания. Для этого образец и вещество сравнения хроматографируются в одинаковых условиях. Относительное время удерживания вычисляется как отношение чистого времени удерживания образца к таковому вещества сравнения. Кроме того, относительное время удерживания может быть аккуратно измерено только в том случае, если условия постоянны и время удерживания анализируемого образца и образца сравнения не очень сильно отличаются друг от друга. Постоянные условия могут быть соблюдены только при использовании того же самого прибора и колонки.

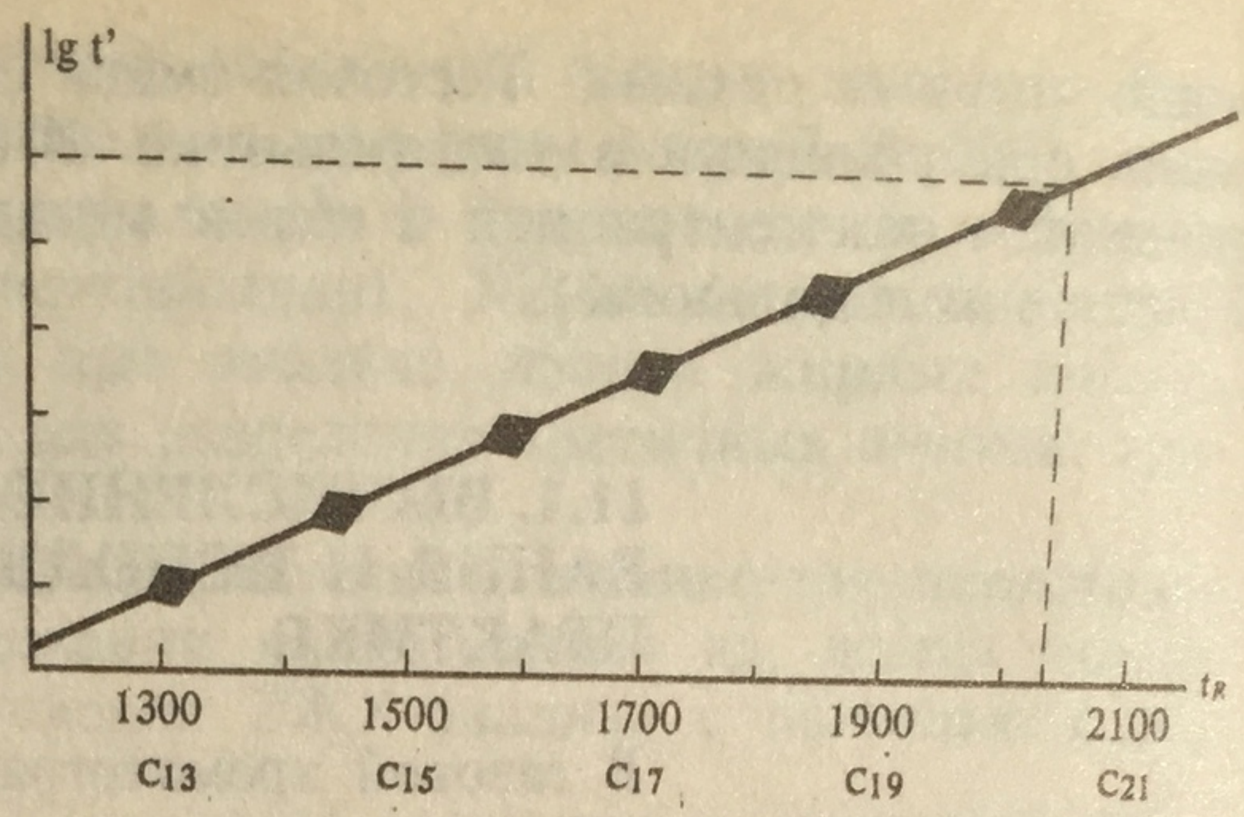
Наиболее широко распространенным приемом, обеспечивающим сравнимость и воспроизводимость внутри- и межлабораторных данных по удерживанию, является использование индексов удерживания, разработанных Ковачем (1958) для распределительной хроматографии и основанных на использовании н-алканов как веществ сравнения.

Эта система сравнивает чистое время удерживания (или объемы) анализируемого соединения и чистое время удерживания н-алканов, элюируемых до и после вещества, и основана на линейном отношении между логарифмом чистого времени удерживания н-алканов и количеством атомов углерода в его молекуле. По определению гомологов C_nH_{2n+2} для RI равно 100 n. Индекс удерживания (RI) соединения А может затем быть получен из простого графика (рис. 11).

Если индексы удерживания определены адекватно, по хорошо выверенной методике, они затем могут быть использованы как справочные в любых лабораториях.

Межлабораторное стандартное отклонение измеренных RI находится в пределах 15 — 20 единиц RI, при скрининге "поисковое окно" должно находиться в пределах ± 50 — 60 единиц RI, если

Рис. 11. Зависимость исправленного времени удерживания вещества от индекса удерживания исследуемого вещества



сравнивается RI неизвестного соединения с RI известных веществ. В условиях программированной температуры существует более линейное отношение между количеством атомов углерода н-алканов и временем удерживания. Это линейное отношение может быть использовано для вычисления значений RI.

Индексы удерживания могут быть использованы для характеристики веществ и стационарных фаз, для предсказания хроматографической динамики функциональных групп или для получения информации о химической структуре неизвестного соединения. Однако наибольшая ценность состоит в их применении для идентификации неизвестных веществ путем сравнения с коллекцией банка данных RI известных веществ. Применительно к ХТА такой банк данных должен содержать как можно больше веществ, имеющих токсикологическое значение, их метаболиты, а также соединения, встречающиеся в биологических матрицах и часто интерферирующие с анализируемым соединением (пластификаторы, стабилизаторы, хлорорганические пестициды, полихлорированные бифенилы и т.д.).

Надежное определение значений RI в токсикологическом анализе требует соблюдения следующих правил:

— все этапы анализа выполняются аккуратно, в постоянных условиях. Измерение времени должно быть сделано с ошибкой менее чем ± 0,5 секунды. Электронные измерения предпочтительны. Если хроматограммы исследуются ручным способом, скорость бумаги должна быть по возможности наименьшей. Объем образца и его концентрация должны быть подобраны таким образом, чтобы колонка не перегружалась;

— неизвестное вещество или образец сначала анализируются при программируемой температуре в тех же самых условиях, в которых определены индексы удерживания н-алканов. Начальная температура должна быть около 100°С для того, чтобы детектировать соединения высокой летучести, а конечная температура должна быть 280 — 300°С для детектирования соединений низкой летучести. Это позволит, во-первых, найти алканы сравнения, которые необходимы, а во-вторых, выбрать температуру для частного изотермического анализа и, в конце концов, точно определить RI

неизвестного вещества. Как правило, выбранная температура должна составлять $^1/_{10}$ от значения RI неизвестного вещества. Надежное определение RI может быть сделано в этом случае, только если температура достаточно воспроизводима. Наилучший способ определения точного RI — совместное инжектирование образца и веществ сравнения, однако это невозможно, когда хроматограмма содержит много пиков. В таком случае образец и вещества сравнения хроматографируются в двух последовательных определениях.

Так как индексы удерживания зависят от температуры, их документирование требует информации о температуре, при которой они были определены. Однако температурную зависимость можно игнорировать при использовании достаточно большого "поискового окна". Это также применимо к значениям RI, полученным в условиях программируемой температуры. В частности, в предлагаемой табл. 34 температурная индикация может быть опущена при условии, что исследователь выберет подходящую температуру и "поисковое окно" в ± 50 — 60 единиц для идентификации неизвестных веществ. Некоторые лекарственные вещества разлагаются или выходят длинным хвостом на диметилсиликоновой фазе. В этом случае может быть необходимым инжектирование большого количества вещества, чтобы пик был заметен. Например, аметазол, морфин и другие фенолы, флюореназин. Из-за разложения можно получить пики, которые не являются пиками вещества, которое инжектировано. Например, соединения четвертичных аммонийных оснований могут диметилироваться в инжекционном узле (на входе колонки), давая третичные амины.

11.2. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ В МОЧЕ

Метод газожидкостной хроматографии широко используется в анализе органических соединений, в том числе наркотических и лекарственных веществ. Его преимущества общепризнаны и определяются широким выбором хроматографических колонок и детекторов. Метод газожидкостной хроматографии может быть использован в скрининге наркотических и других одурманивающих средств и применительно к такому сложному объекту, как моча.

При использовании 10 мл мочи можно обнаружить и идентифицировать большинство соединений, за потреблением которых установлен контроль. Предел обнаружения анализируемых веществ в объекте представлен в табл. 34.

А. Подготовка проб

Выделение наркотических и одурманивающих веществ жидкость-жидкостной экстракцией

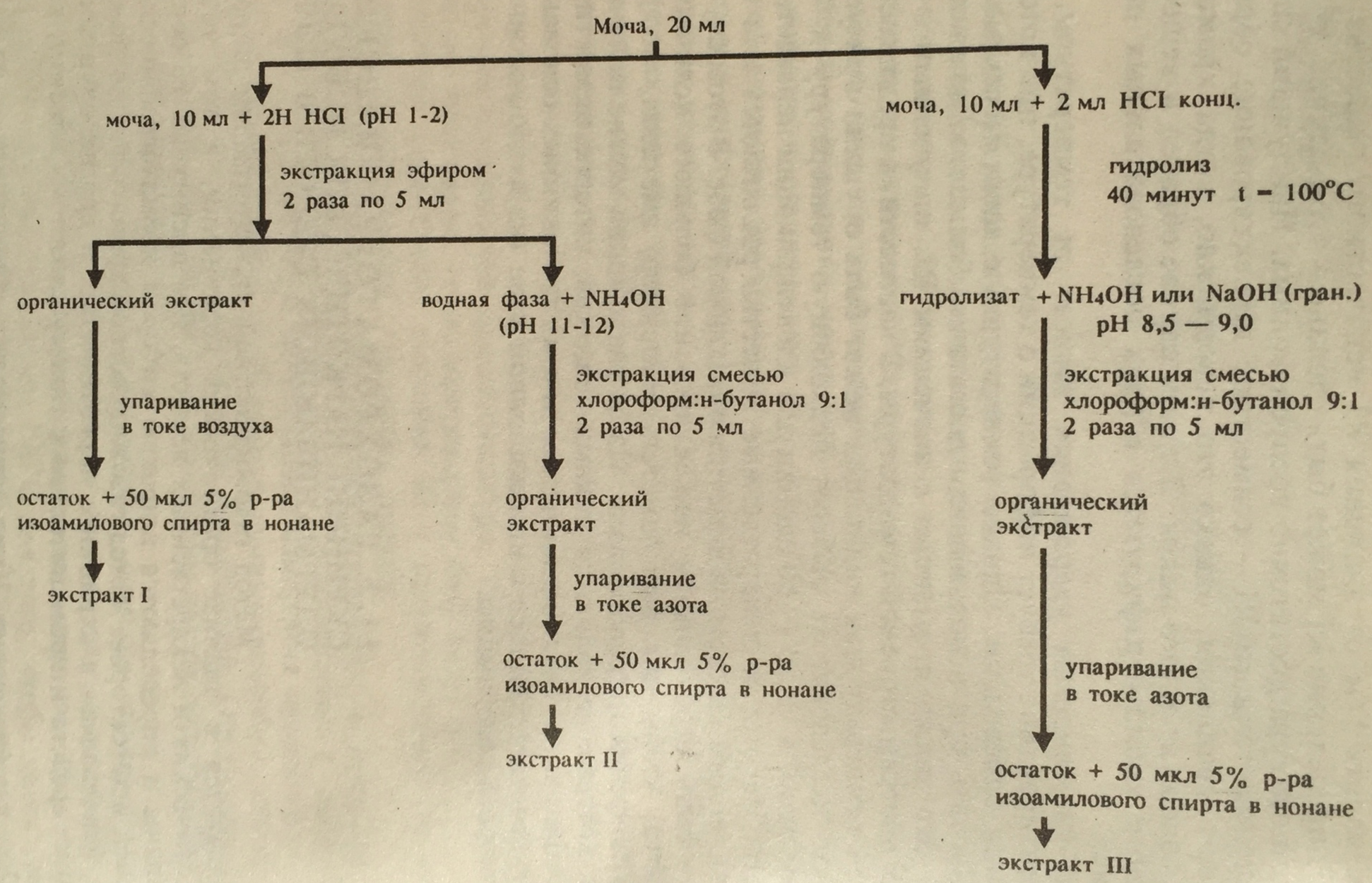


Схема 27

Пробоподготовка жидкость-жидкостной экстракцией. Для проведения общего газохроматографического скрининга необходимо 20 мл мочи, которая разделяется на две равные части и анализируется по схеме 27.

К первой части пробы добавляется 2 н HCl до значения pH=1 — 2 по универсальному индикатору и проводится экстракция эфиром дважды порциями по 5 мл. Время экстракции — 5 минут. Для разделения фаз экстракционную смесь необходимо центрифугировать со скоростью 3000 об/мин в течение 5 — 10 минут. Эфирные экстракты объединяются и пропускаются через безводный сульфат натрия (1 — 2 г) на бумажном фильтре, смоченном эфиром. Фильтр промывается 2 — 3 мл эфира. Таким образом получают экстракт I. К водной фазе добавляется 25%-ный раствор аммиака до значения pH=11 — 12 и проводится экстракция смесью хлороформ — н-бутанол (9:1) дважды, порциями по 5 мл. Время экстракции — 5 минут. Для разделения фаз экстракционную смесь центрифугируют со скоростью 3000 об/мин в течение 5 — 10 минут. Органические экстракты объединяются и пропускаются через безводный сульфат натрия на бумажном фильтре, смоченном экстрагентом. Фильтр промывается 2 — 3 мл экстрагента. Таким образом получают экстракт II.

Ко второй части пробы добавляют 2 мл концентрированной HCl и нагревают в герметично закрытом сосуде на глицериновой бане при 110°C в течение 40 минут. После охлаждения гидролизат фильтруют через бумажный фильтр, смоченный дистиллированной водой, и промывают фильтр 2 — 3 мл дистиллированной воды.

Таблица 34. **Индексы удерживания и предел обнаружения наркотических и одурманивающих веществ (3%-ный SE-30 на хромосорбе W-HP-80 — 100 меш)**

А. Вещества кислотного, нейтрального и слабоосновного характера

Вещество	Предел обнаружения, мкг/мл мочи		
	RI	NPD	ТАД
Барбитал	1490	0,6	0,1
Бутабарбитал	1680	0,6	0,1
Барбамил	1732	0,6	0,1
Этаминал	1743	0,6	0,1
Мепробамат	1790	0,5	0,5
Ноксирон	1838	0,6	0,2
Гексобарбитал	1861	0,8	0,15
Фенобарбитал	1974	0,8	0,15
Циклобарбитал	1980	1,2	0,2
Гексамидин	2357	0,6	0,1

Б. Вещества основного характера

Вещество	RI	Предел обнаружения, мкг/мл мочи
1	2	3
Амфетамин	1176	0,1
Метамфетамин	1220	0,07
Эфедрон	1360	0,2
Эфедрин	1383	0,2
Кофеин	1816	0,15
Промедол	1838	0,1
Димедрол	1856	0,1
Фенциклидин	1914	0,1
Атропин	2173	0,1
Кокаин	2175	0,1
Супрастин	2182	0,1
Амитриптилин	2193	0,15
Нортриптилин	2215	0,15
Имипрамин	2225	0,15
Мезапам	2232	0,1
Дипразин	2275	0,1
Терален	2280	0,2
Скополамин	2316	0,1
Промазин	2329	0,1
Оксазепам	2346	0,1
Кодеин	2383	0,08
Дионин	2410	0,1
Диазепам	2455	0,1
Морфин	2450	0,3
Тебаин	2510	0,1
Хлорпротиксен	2512	0,2
Аминазин	2515	0,2
Тизерцин	2516	0,15
Трифтазин	2665	0,2
Триседил	2670	0,2
Феназепам	2686	0,12
Нитразепам	2770	0,25
Хлозепид	2450, 2530, 2798	0,15
Папаверин	2848	0,15
Галоперидол	2938	1,1
Тиоридазин	3110	0,9
Наркотин	3165	1,0

В. Продукты гидролиза производных 1,4-бензодиазепина (бензофеноны)

Вещество	Индекс удерживания	Предел обнаружения, мкг/мл мочи	Нативное вещество	Индекс удерживания
2-амино-5-хлор-бензофенон (АХБ)	2010	0,12	Хлозепид	2450, 2530, 2798
			Оксазепам	2346
			Мезапам	2232
			Диазепам	2455
2-метиламино-5-хлор-бензофенон (МХБ)	2065	0,1	Диазепам	2455
			Мезапам	2232
2,5-диаминобензофенон (ДАБ)	2168	0,08	Нитразепам	2770
2-амино-5-бром-2-хлор-бензофенон (АБХБ)	2255	0,1	Феназепам	2686
2-амино-5-нитробензофенон (АНБ)	2342	0,1	Нитразепам	2770

Примечание.
"Окошко поиска" большинства веществ ± 20 единиц индекса.
"Окошко поиска" фенобарбитала ± 25 единиц индекса.
"Окошко поиска" эфедрона, эфедрина, морфина ± 30 единиц индекса.
"Окошко поиска" нитразепама ± 50 единиц индекса.
"Окошко поиска" кофеина ± 80 единиц индекса (при среднем значении RI = 1882).

К фильтрату добавляется 25%-ный раствор аммиака до значения pH=8,5 — 9,0 по универсальному индикатору и проводится экстракция смесью хлороформ — н-бутанол (9:1) дважды, порциями по 5 мл. Время экстракции — 5 минут. Для разделения фаз экстракционную смесь центрифугируют со скоростью 3000 об/мин в течение 5 — 10 минут. Органические экстракты объединяются и пропускаются через безводный сульфат натрия на бумажном фильтре, смоченном экстрагентом. Фильтр промывается 2 — 3 мл экстрагента. Таким образом получают экстракт III.

Аликвоты элюатов, соответствующие 10 мл мочи, выпаривают в токе воздуха (элюат кислой мочи) и азота (элюат щелочной мочи). Остатки растворяют в 50 мкл 5%-ного раствора изоамилового спирта в нонане. Для газохроматографического скрининга необходимы аликвоты элюатов, соответствующие 10 мл мочи.

2. Выделение наркотических и лекарственных веществ из мочи сорбцией

Изолирование сорбцией следует проводить в соответствии с методическими рекомендациями "Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Изолирование сорбцией" (схема 28).

Выделение лекарственных и наркотических веществ из мочи сорбцией

Моча 50 мл + 2 н HCl pH 1-2 → сорбция на полисорбе-1 →
→ элюирование этилацетатом (25 — 30 мл) — элюат I

Моча 50 мл + NH_4OH pH 8,5 — 9,0 → сорбция на полисорбе-1 →
→ элюирование смесью хлороформ-изопропанол (3:1) (25 — 30 мл) — элюат II

Схема 28

Примечание. Образцы мочи должны храниться в холодильнике не более 5 суток.

Б. Условия газохроматографического анализа наркотических и одурманивающих средств

Газовый хроматограф ЛХМ-80 с термоаэрозольным детектором (ТАД) или Perkin — Elmer F-22 с беспламенным азотно-фосфорным детектором (NPD). Колонка стеклянная, силанизированная, длиной 1 м, внутренний диаметр 2 — 3 мм. Сорбент — 3%-ный SE-30 на хромосорбе W (HP)-80 — 100 меш. Скорость газа-носителя — 45 мл/мин азота для ТАД и 40 мл/мин гелия для NPD. Эффективность хроматографических колонок по додекану при 100°С для ТАД и NPD соответственно 1200 т.т и 1350 т.т. Селективность детектирования оптимизирована по кофеину и гексадекану. При этом установлены следующие расходы вспомогательных газов: для ТАД — 18 мл/мин водорода, 200 мл/мин воздуха, 135 мл/мин азота через генератор аэрозоля с хлоридом рубидия при температуре генератора 510°С; для NPD с шариком силиката рубидия — 1 мл/мин водорода и 60 мл/мин воздуха. Температура детектора 300°С. Температура испарителя 250°С. Температура термостата колонки изменяется по линейной программе от 130 до 290°С со скоростью 20°С в минуту. Выдерживание при конечной температуре занимает до 15 минут общего времени анализа. Объем вводимой пробы — 2,5 мкл.

В. Идентификация хроматографических пиков

Идентификация хроматографических пиков проводится по индексам удерживания.

Определение индексов удерживания. Для расчета индексов удерживания при работе с ТАД в качестве стандартов используются смеси н-алканов с числом атомов углерода от 10 до

32. Для регистрации углеводородов ТАД следует перевести в неселективный режим (отключить нагрев генератора аэрозоля и подачу азота в генератор) пламенно-ионизационного детектора.

Расчет индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки проводится с использованием абсолютного времени удерживания по формуле

$$RI(A) = 100(y - x) \cdot \frac{t_R(A) - t_R(x)}{t_R(y) - t_R(x)} + 100x,$$

где RI(A) — индекс удерживания анализируемого вещества (A);
$t_R(A)$ — время удерживания анализируемого вещества;
$t_R(x)$ — время удерживания углеводорода с (x) числом атомов углерода;
$t_R(y)$ — время удерживания углеводорода с (y) числом атомов углерода, при этом $t_R(y) > t_R(A) > t_R(x)$.

Беспламенный азотно-фосфорный детектор практически не дает отклика на углеводороды без перегрузки колонки. Поэтому для расчета индексов удерживания при работе с NPD в качестве стандартов вместо н-алканов следует использовать смесь анализируемых азотсодержащих веществ, индексы удержания которых предварительно определены по н-алканам при тех же условиях газохроматографического анализа с подключением к колонке пламенно-ионизационного детектора.

Формула расчета индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки с использованием в качестве стандартов азотсодержащих веществ:

$$RI(A) = [RI(w) - RI(v)] \cdot \frac{t_R(A) - t_R(v)}{t_R(w) - t_R(v)} + RI(v),$$

где RI(A) — индекс удерживания анализируемого вещества (A);
$t_R(A)$ — время удерживания анализируемого вещества;
RI(v) — индекс удерживания;
$t_R(v)$ — время удерживания вещества, используемого в качестве стандарта, выходящего из колонки до анализируемого вещества;
RI(w) — индекс удерживания;
$t_R(v)$ — время удерживания вещества, используемого в качестве стандарта, выходящего из колонки после анализируемого вещества.

Состав смеси азотсодержащих веществ для расчета индексов удерживания указан в табл. 35.

Таблица 35. **Смесь анализируемых веществ для расчета индексов удерживания**

Вещество	Индекс удерживания по н-алканам
Метамфетамин	1220
Барбитал	1490
Промедол	1838
Новокаин	2022
Амитриптилин	2193
Кодеин	2382
Папаверин	2820
Стрихнин	3110

Смесь для расчета индексов удерживания при работе с NPD содержит по 50 мкг/мл каждого компонента в виде основания и 350 мкг/мл барбитала. Растворитель — этанол.

Для надежного определения индексов удерживания следует:

— в качестве стандартов использовать н-алканы, отличающиеся друг от друга на один или два атома углерода с содержанием 100 мкг/мл каждого компонента в гексане или октане;

— для расчета индекса удерживания использовать стандарты, ближайшие по времени удерживания к анализируемому веществу;

— проводить измерение времени удерживания анализируемых веществ и стандартов при одинаковых условиях газохроматографического анализа;

— регистрацию времени удерживания проводить с высокой точностью; применение интегратора предпочтительнее измерения секундомером (например, ошибка измерения времени удерживания в 3 секунды может дать изменение индекса удерживания на 12,5 единицы индекса);

— не перегружать хроматографическую колонку пробой, при необходимости проводить разбавление.

Дополнительную информацию для идентификации дает форма хроматографического пика. Тенденцию к хвостообразованию на диметилполисиликоновой фазе имеют: морфин, кофеин, фенобарбитал, амитриптилин, эфедрин, эфедрон, нитразепам.

Г. Особенности ГЖХ-анализа экстрактов и элюентов из мочи

При проведении общего газохроматографического скрининга наркотических и одурманивающих веществ анализ следует выполнять на максимально возможной чувствительности электрометра, которая ограничивается фоном хроматографической колонки при программировании температуры и фоном эндогенных соединений мочи. Для снижения фона эндогенных соединений мочи сухие остатки экстрактов и элюентов следует растворять в 50 мкл 5%-ного раствора изоамилового спирта в нонане.

Следует отметить, что:

— фон эндогенных соединений во многом определяет предел обнаружения анализируемых веществ;

— фон эндогенных веществ после гидролиза мочи больше;

— на значения индексов удерживания анализируемых веществ какого-либо влияния эндогенных соединений не установлено.

Предлагаемая методика газохроматографического скрининга позволяет проводить предварительное обнаружение в моче не менее 80 соединений кислотного, нейтрального и основного характера. Пробоподготовка является простой и универсальной, что делает возможным применение ВЭЖХ, ГХ/МС в качестве подтверждающих методов. Анализ одной пробы проводится за 2 часа (пробоподготовка — 1 час, газохроматографический анализ — 1 час).

Барбитураты обнаруживаются в кислых экстрактах мочи; если для пробоподготовки используется предварительный гидролиз, они частично экстрагируются при значении pH=8,5 — 9,0.

Производные 1,4-бензодиазепина частично экстрагируются при кислых значениях pH среды (экстракт I), но в основном попадают в экстракт II. После гидролиза обнаруживаются преимущественно в виде бензофенонов.

Опийные алкалоиды обнаруживаются в экстракте II (кроме морфина) и экстракте III.

При обнаружении производных фенотиазина на хроматограммах щелочных экстрактов отмечаются многочисленные пики метаболитов.

Следует учитывать, что некоторые нативные вещества основного характера разрушаются при гидролизе (димедрол, атропин, скополамин, кокаин, новокаин, лидокаин), а значение pH=8,5 — 9,0 не является оптимальным для экстракции производных фенотиазина, атропина, скополамина, димедрола и др.

На рис. 12 — 17 представлены хроматограммы экстрактов мочи, к которой добавлены известные количества нескольких анализируемых веществ.

На рис. 18 — 22 — хроматограммы экстрактов мочи обследуемых лиц, злоупотребляющих некоторыми лекарственными препаратами.

Многие лекарственные соединения, которые не относятся к наркотическим и одурманивающим веществам, имеют индексы удерживания, близкие к индексам удерживания анализируемых веществ, и могут влиять на результаты идентификации при их одновременном присутствии в моче (сравните табл. 36 и 34). В моче легко обнаруживаются кофеин и его метаболиты.

Следует отметить, что индексы удерживания анализируемых веществ имеют тенденцию к зависимости от концентрации анализируемого вещества в растворе. Четко выраженную зависимость от концентрации имеют индексы удерживания нитразепама, кофеина, морфина, эфедрина, эфедрона, фенобарбитала, теофиллина, стрихнина, хинина.

В связи с концентрационной зависимостью индексов удерживания каждое соединение имеет определенный диапазон значений индекса удерживания — "окошко поиска". Для большинства веществ "окошко поиска" составляет ± 20 единиц индекса от среднего значения индексов удерживания, представленных в табл. 34, 36.

"Окошки поиска" некоторых веществ перекрываются. Поэтому на этапе предварительного обнаружения в таких случаях следует ориентироваться на несколько веществ с перекрывающимися "окошками поиска".

Необходимо учитывать, что экстракт III получают без предварительной экстракции при кислом значении pH среды. Поэтому при pH=8,5 — 9,0 наряду с веществами основного характера экстрагируются вещества кислотного (барбитураты, теофиллин), нейтрального (мепробамат) и слабоосновного характера (кофеин, антипирин, амидопирин).

Таблица 36. **Индексы удерживания лекарственных соединений, не подлежащих обязательному контролю (3%-ный SE-30 на хромосорбе W-HP 80 — 100 меш)**

Вещество	Индекс удерживания
А. ВЕЩЕСТВА КИСЛОТНОГО, НЕЙТРАЛЬНОГО И СЛАБООСНОВНОГО ХАРАКТЕРА	
Ацетанилид	1434
Ниаламид	1523
Изониазид	1672
Ноотропил	1768
Фенацетин	1773
Баклофен	2090
Теофиллин	2170
Вольтарен	2175
Бутадион	2342
Фенитоин	2345
Индометацин	2685
Б. ВЕЩЕСТВА ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА	
Анестезин	1541
Сальсолидин	1771
Пахикарпин	1802
Мидокалм	1868
Лидокаин	1890
Амидопирин	1913
Антипирин	1975
Пилокарпин	2010
Новокаин	2022
Дибазол	2111
Спазмолитин	2185
Циклодол	2242
Платифиллин	2314
Карбамазепин	2311, 1920
Хинидин	2807
Хинин	2809
Циннаризин	3070
Стрихнин	3110

Предлагаемую методику общего газохроматографического скрининга наркотических и одурманивающих веществ следует применять для отсева отрицательных проб и предварительного обнаружения в положительных образцах веществ различных фармакологических групп. Все пробы, давшие положительный результат, подтверждаются в дальнейшем с учетом предварительной идентификации любым другим надежным методом.

3. Газохроматографическое обнаружение фенилалкиламинов* в моче

Предлагаемая методика газохроматографического анализа позволяет проводить обнаружение метамфетамина, амфетамина, эфедрона, эфедрина и норэфедрина в моче без их предварительной дериватизации с использованием пламенно-ионизационного детектора. Газохроматографическое разделение анализируемых веществ можно проводить как при программировании температуры колонки, так и в изотермическом режиме. Время анализа не превышает 12 минут. Мешающего влияния фона эндогенных веществ мочи не установлено.

а) Пробоподготовка

К 10 мл мочи добавляется 1 н раствор гидроксида натрия до значения pH=11 (по универсальному индикатору) и 5 мл бензола. Проводится экстракция в течение 5 минут. Для разделения фаз необходимо центрифугирование при скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Отобранная органическая фаза фильтруется через безводный сульфат натрия (1 — 2 г) на бумажном фильтре, смоченном бензолом, и содержимое на фильтре промывается бензолом (1 — 2 мл). К бензольному экстракту добавляется 100 мкл 5%-ного раствора HCl в метаноле. После перемешивания экстракт упаривают в токе воздуха. Сухой остаток растворяют в 50 мкл этанола.

б) Условия ГЖХ-анализа фенилалкиламинов

Газовый хроматограф Хром-5, колонка стеклянная, насадочная, силанизированная, длиной 1 метр, внутренний диаметр — 3 мм. Сорбент — 10%-ный, Карбовакс-1500 на инертоне AW-HMДS, фракция 0,16 — 0,20 мм. Газ-носитель — гелий, скорость — 75 мл/мин. Расход водорода — 30 мл/мин, расход воздуха — 400 мл/мин. Температура испарителя и детектора — 200°С. Температурный режим колонки: анализ можно проводить как при программировании температуры от 130°С со скоростью 15° в минуту

* Вещества данной группы в виде оснований являются летучими. Некоторые окисляются под действием кислорода воздуха. Поэтому для снижения неконтролируемых потерь на стадии выпаривания экстракта необходимо перевести анализируемое вещество в устойчивую солевую форму. Для этого используется 5%-ный раствор HCl в метаноле, который добавляется к бензольному экстракту.

до 200°С и выдерживать конечную температуру до 12 минут общего времени анализа, так и в изотермическом режиме при 170°С для анализа эфедрона, эфедрина и норэфедрина и при 130°С для анализа метамфетамина и амфетамина. Объем вводимой пробы — 2 мкл.

Время удерживания анализируемых веществ и данные, характеризующие эффективность и селективность хроматографического разделения, представлены в табл. 37, 38.

Таблица 37. **Исправленное время удерживания анализируемых веществ**

Вещество	Исправленное время удерживания при программировании температуры	Исправленное время удерживания при 170°С	Исправленное время удерживания при 130°С
Метамфетамин	103"	32"	112"
Амфетамин	114"	32"	131"
Эфедрон	250"	146"	—
Эфедрин	312"	261"	—
Норэфедрин	374"	—	—

Примечание. При программировании температуры колонки можно использовать в качестве стандарта дифениламин. Для этого остаток экстракта следует растворять в 50 мкл раствора дифениламина в этаноле с содержанием 0,3 мг/мл. Исправленное время удерживания дифениламина — 665" (N = 3235 т.т., ВЭТТ — 0,31 мм).

Предел обнаружения анализируемых веществ составляет (мкг/мл): 0,08 — для метамфетамина, 0,10 — для амфетамина, 0,15 — для эфедрона и 0,50 — для эфедрина при анализе 10 мл мочи.

Таблица 38. **Эффективность и селективность разделения анализируемых веществ**

Вещество	Число эффективных теоретических тарелок (N)	Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)	Селективность разделения (α j, i)
Метамфетамин	1930	0,52	
Амфетамин	1936	0,51	1,1
Эфедрон	1475	0,68	2,19
Эфедрин	3600	0,27	1,25
Норэфедрин	2500	0,40	1,2

Примечание. Число эффективных теоретических тарелок рассчитывалось по формуле $N = 16 \cdot (\frac{t'_{уд}}{\omega})^2$, где N — число эффективных теоретических тарелок, $t'_{уд}$ — исправленное время удерживания (мм), ω — ширина основания пика.

Селективность разделения выражена через относительное удерживание (α j,i) двух соседних пиков: $\alpha_{j,i} = t_{уд.j} / t_{уд.i}$, где $t_{уд.j} > t_{уд.i}$

На рис. 23 представлена хроматограмма тестовой смеси, содержащей основания метамфетамина, амфетамина, эфедрона по 100 мкг/мл и дифениламина 300 мкг/мл (растворитель — этанол).

Идентификация. Идентификация анализируемых веществ в моче проводится сравнением исправленного времени удерживания неизвестных пиков и пиков тестовой смеси.

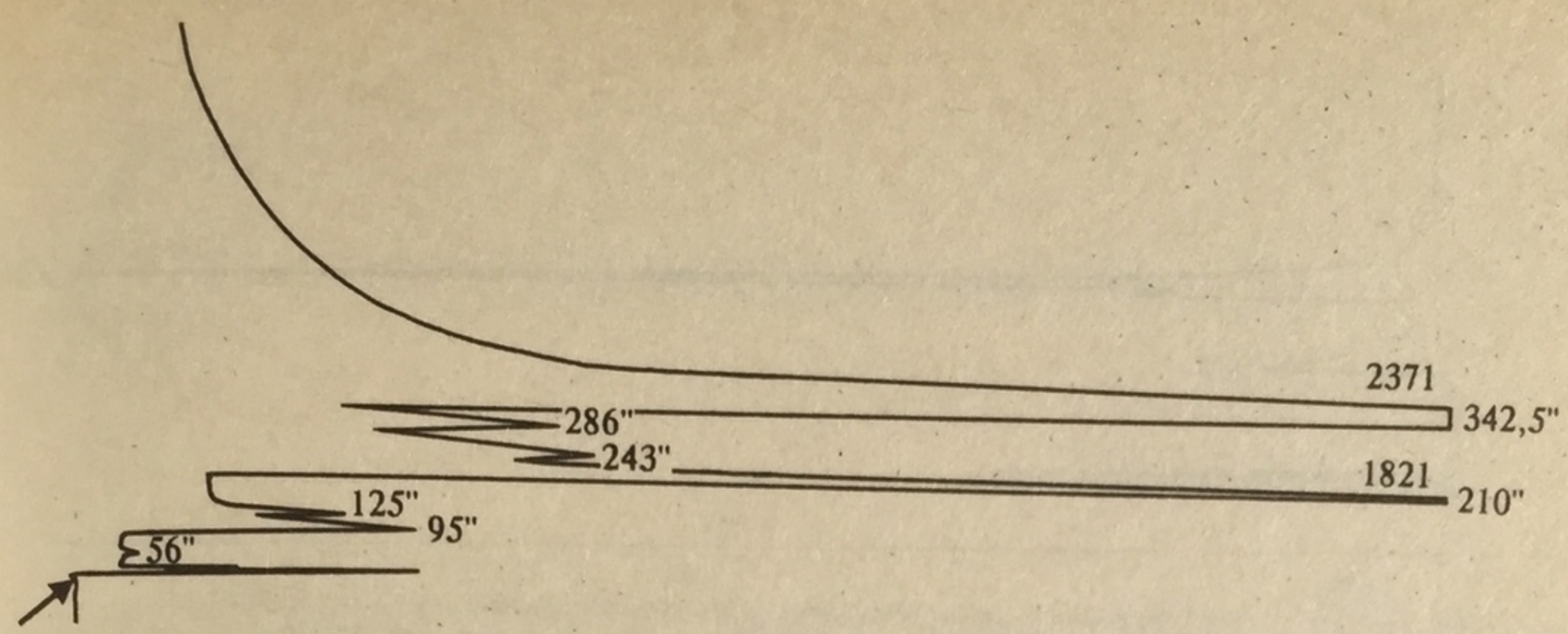


Рис. 12. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей 1 мкг/мл кодеина (модельная смесь).x100x1. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

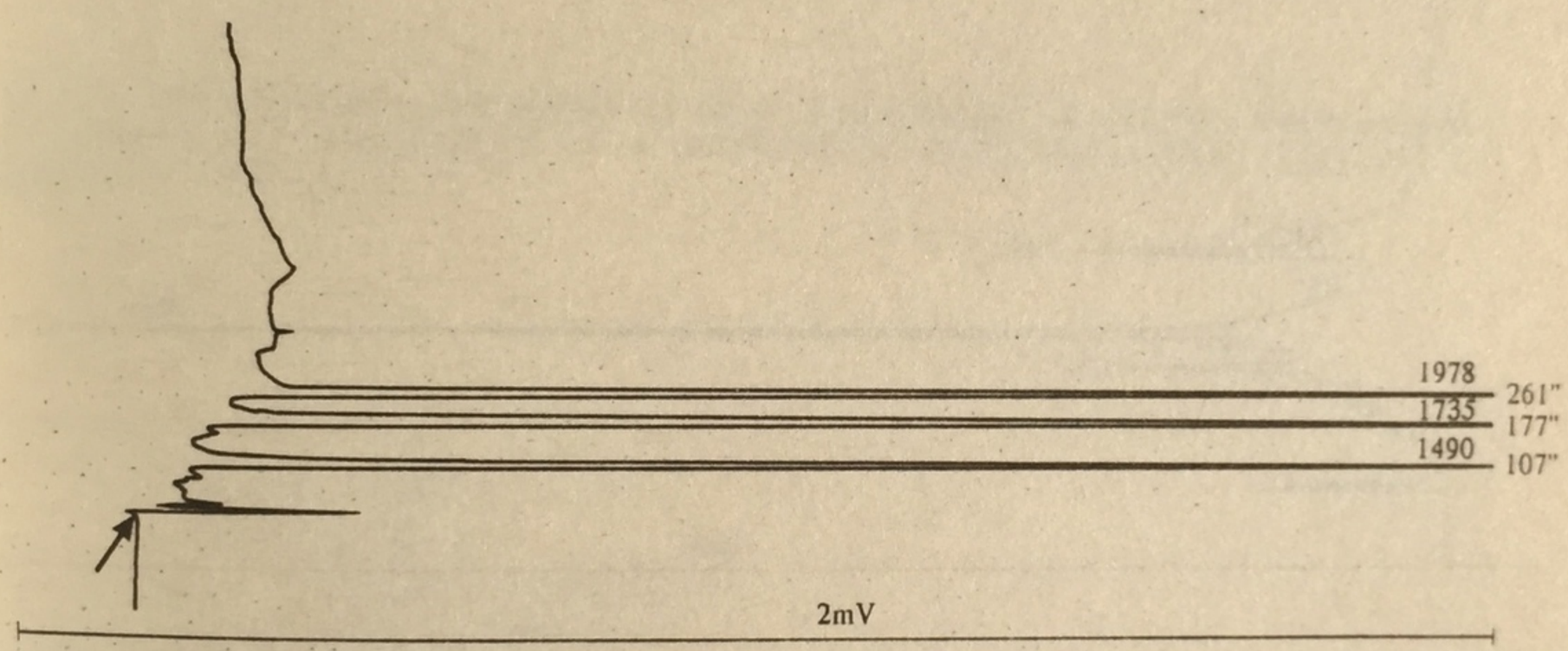


Рис. 13. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей барбитал, этаминал и фенобарбитал по 10 мкг/мл (модельная смесь).x100x4. Экстракт I. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

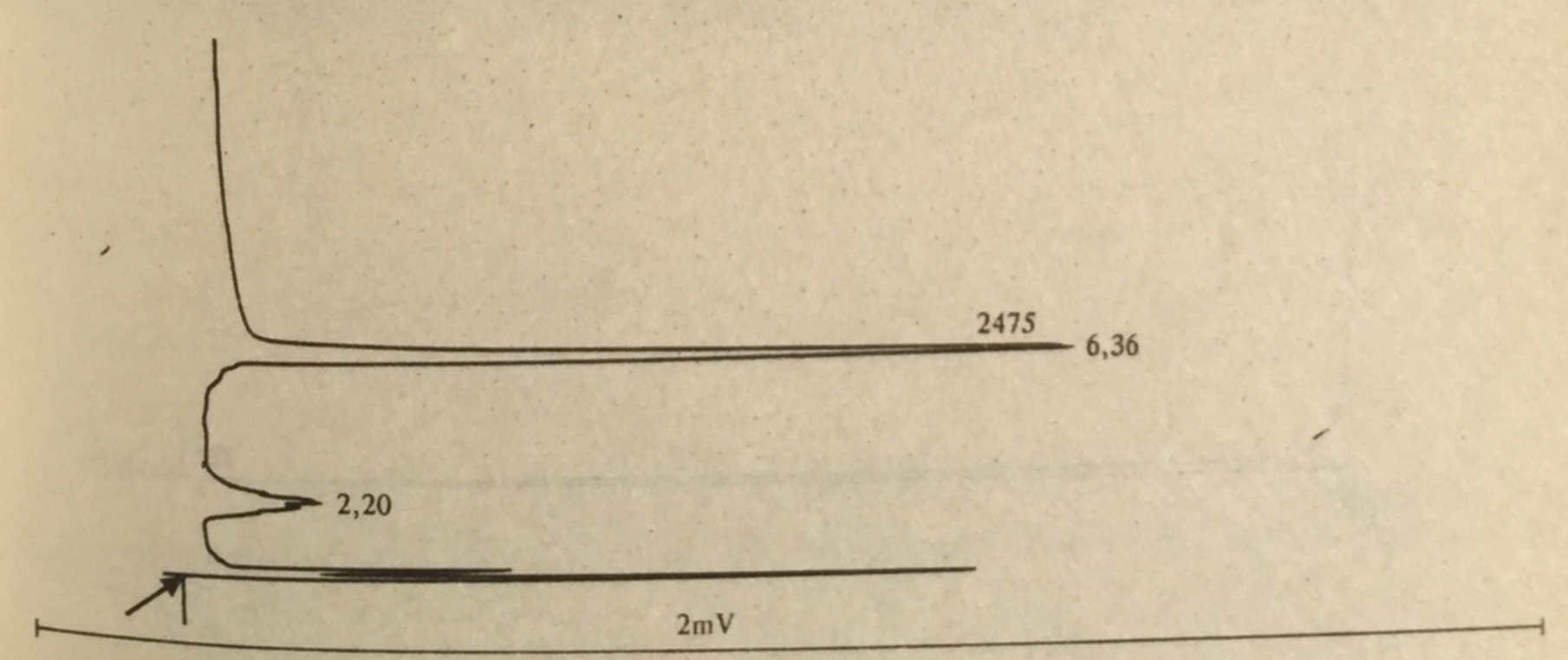


Рис. 14. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей 5 мкг/мл диазепама (модельная смесь).x100x4. Экстракт I. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

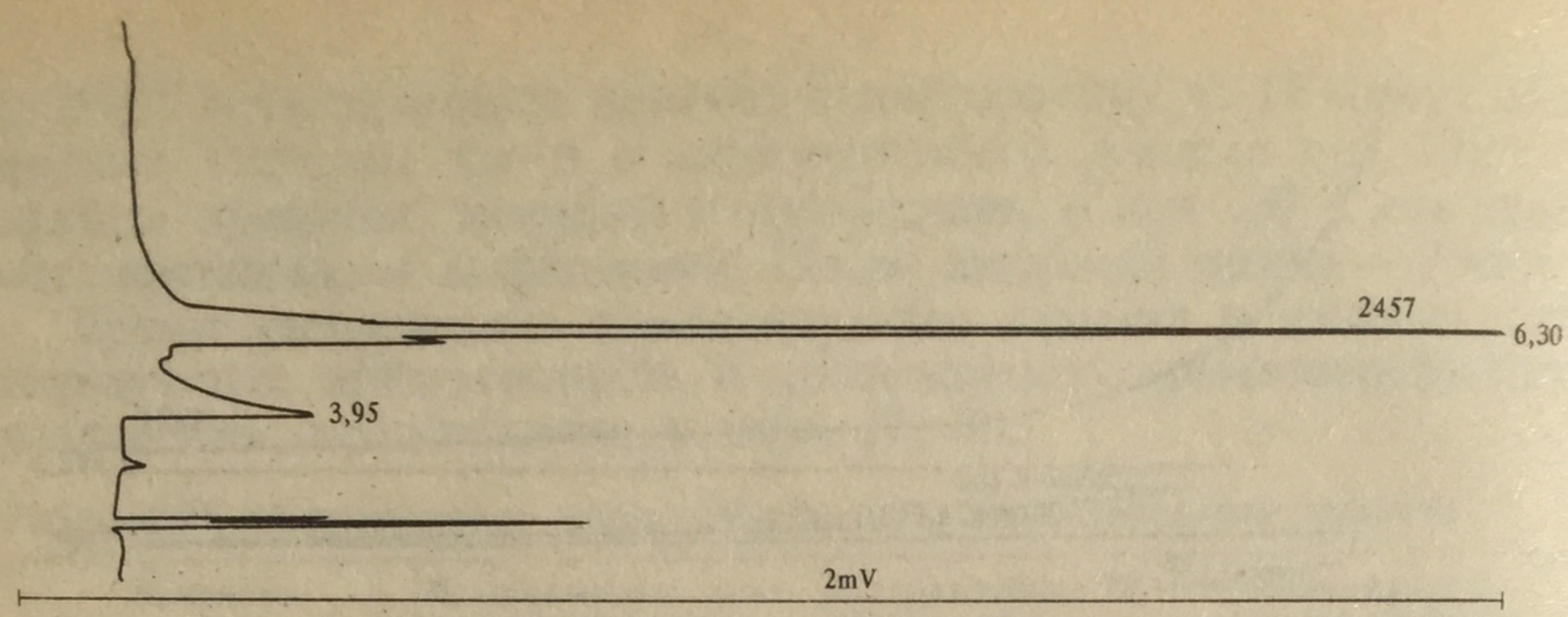


Рис. 15. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей 5 мкг/мл диазепама (модельная смесь).x100x4. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

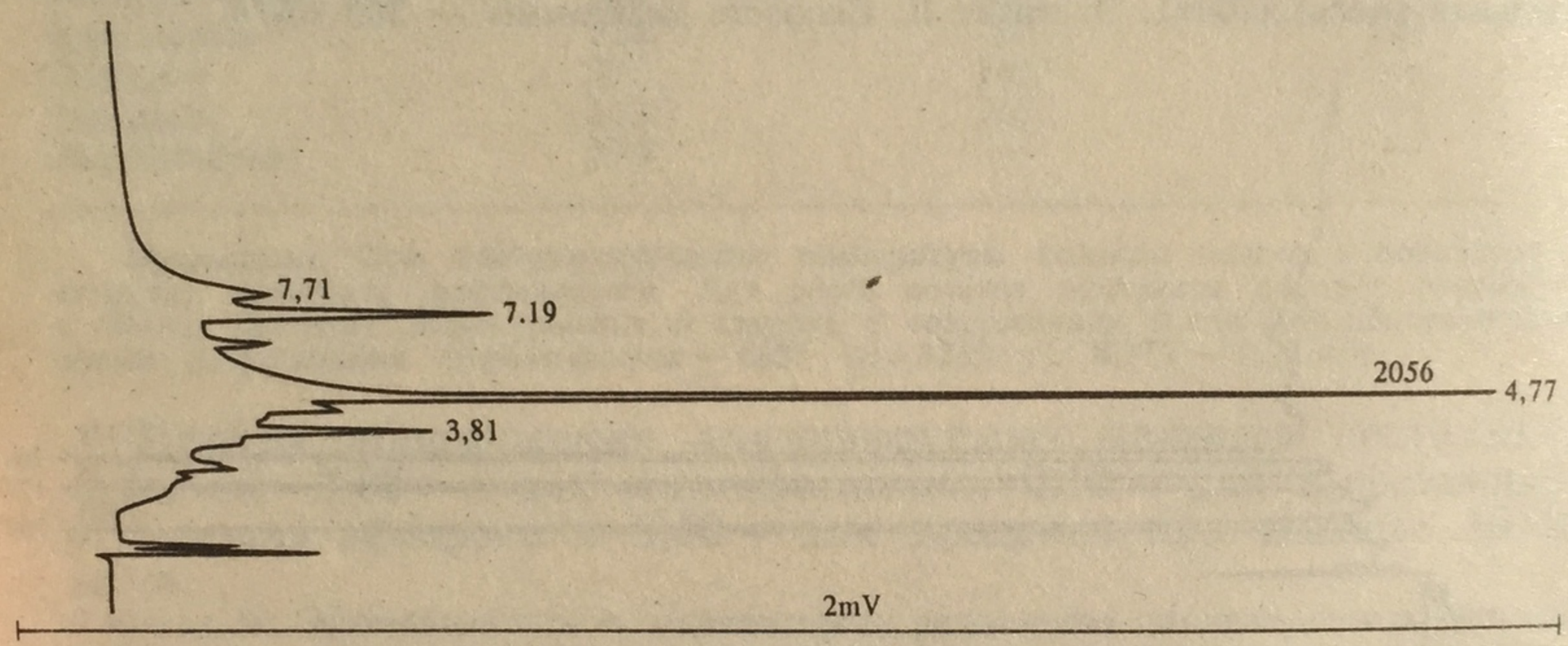


Рис. 16. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей 5 мкг/мл диазепама (модельная смесь).x100x8. Экстракт III (после гидролиза). Скорость диаграммы — 300 мм/ч

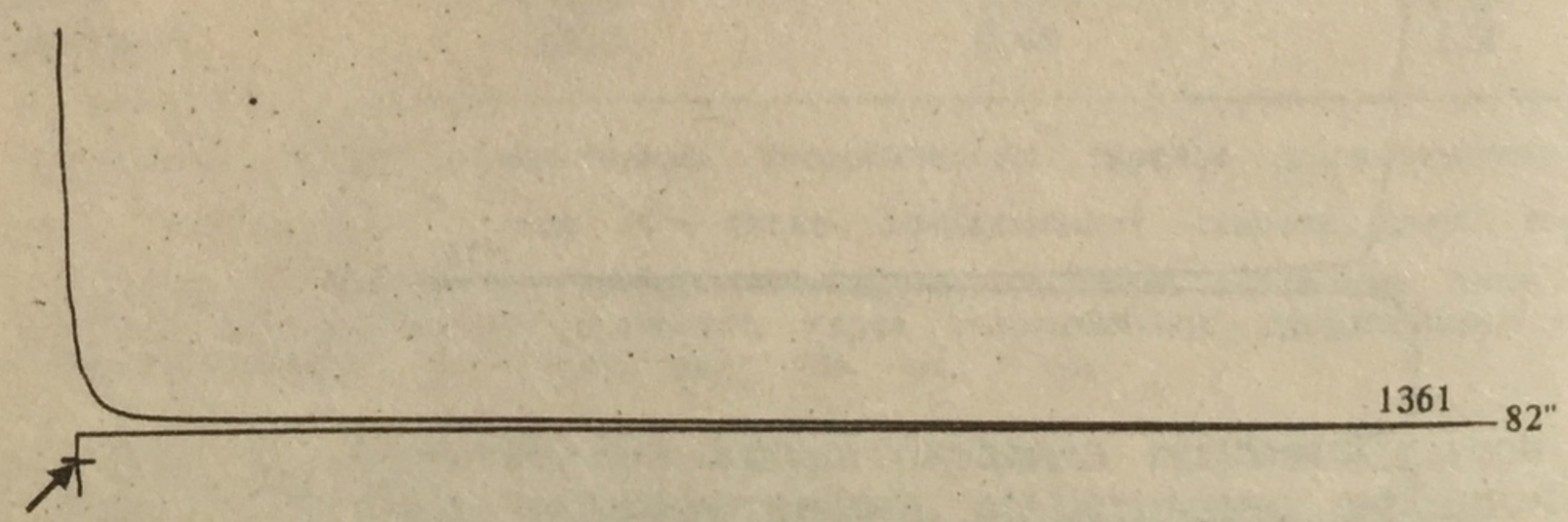


Рис. 17. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей 5 мкг/мл диазепама (модельная смесь).x100x4. Элюат II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

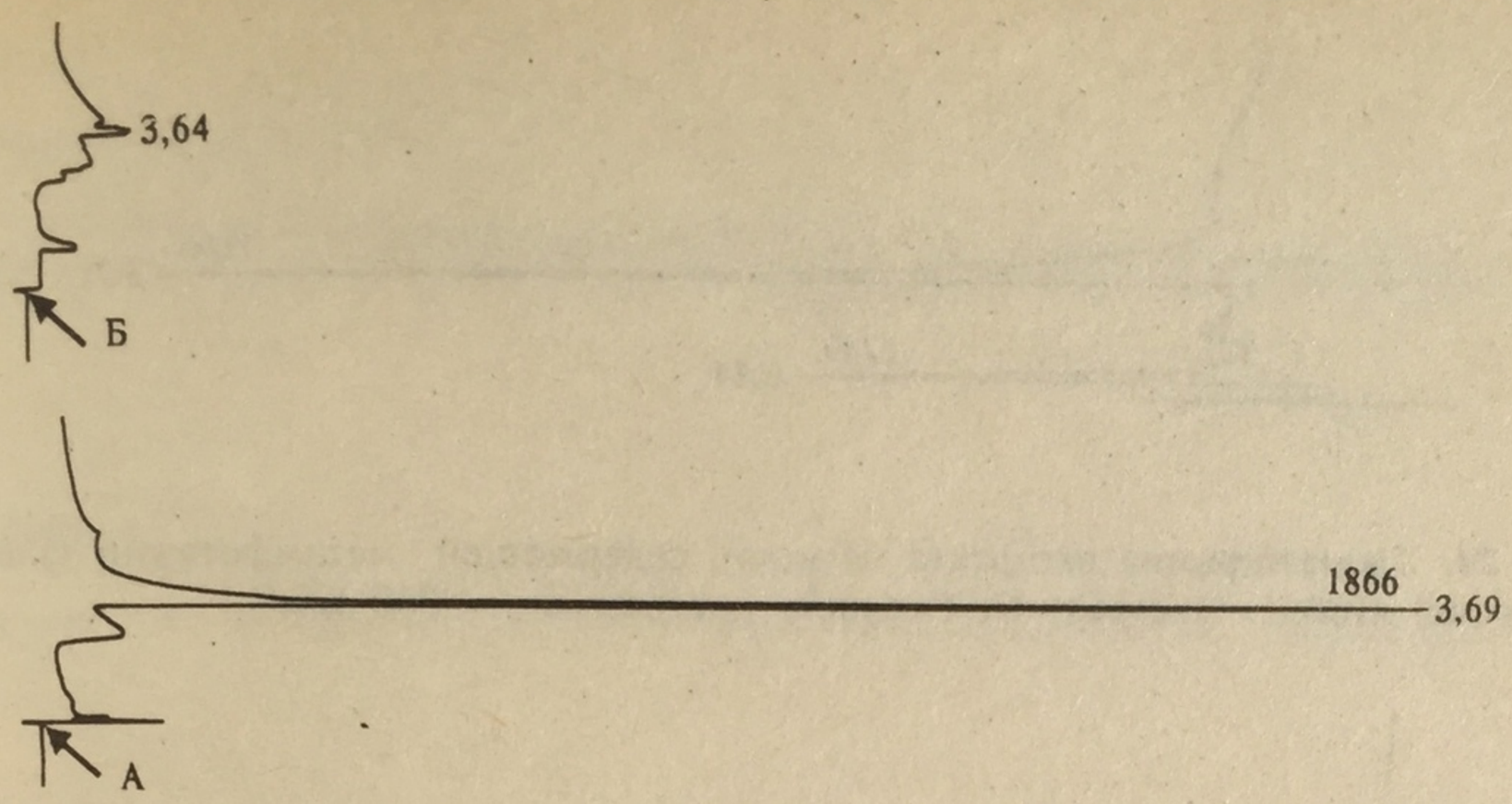


Рис. 18. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей димедрол (злоупотребление).x100x8. А — экстракт II. Б — экстракт III (после гидролиза). Скорость диаграммы — 300 мм/ч

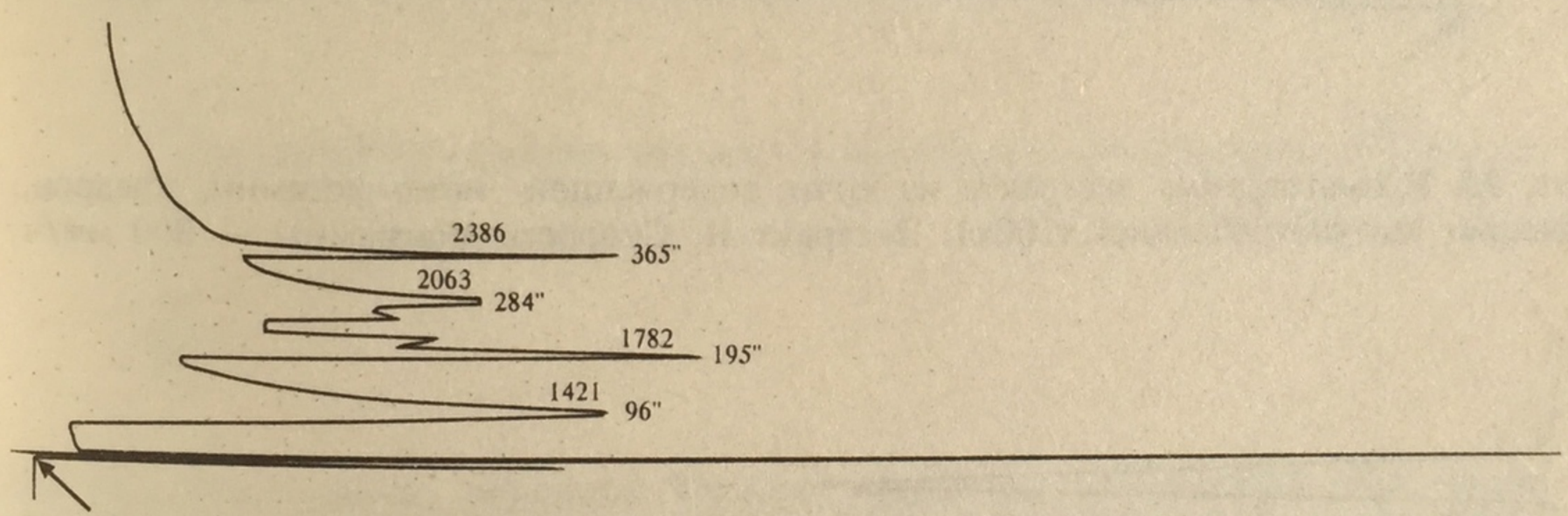


Рис. 19. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей кодеин (злоупотребление).x100x1. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

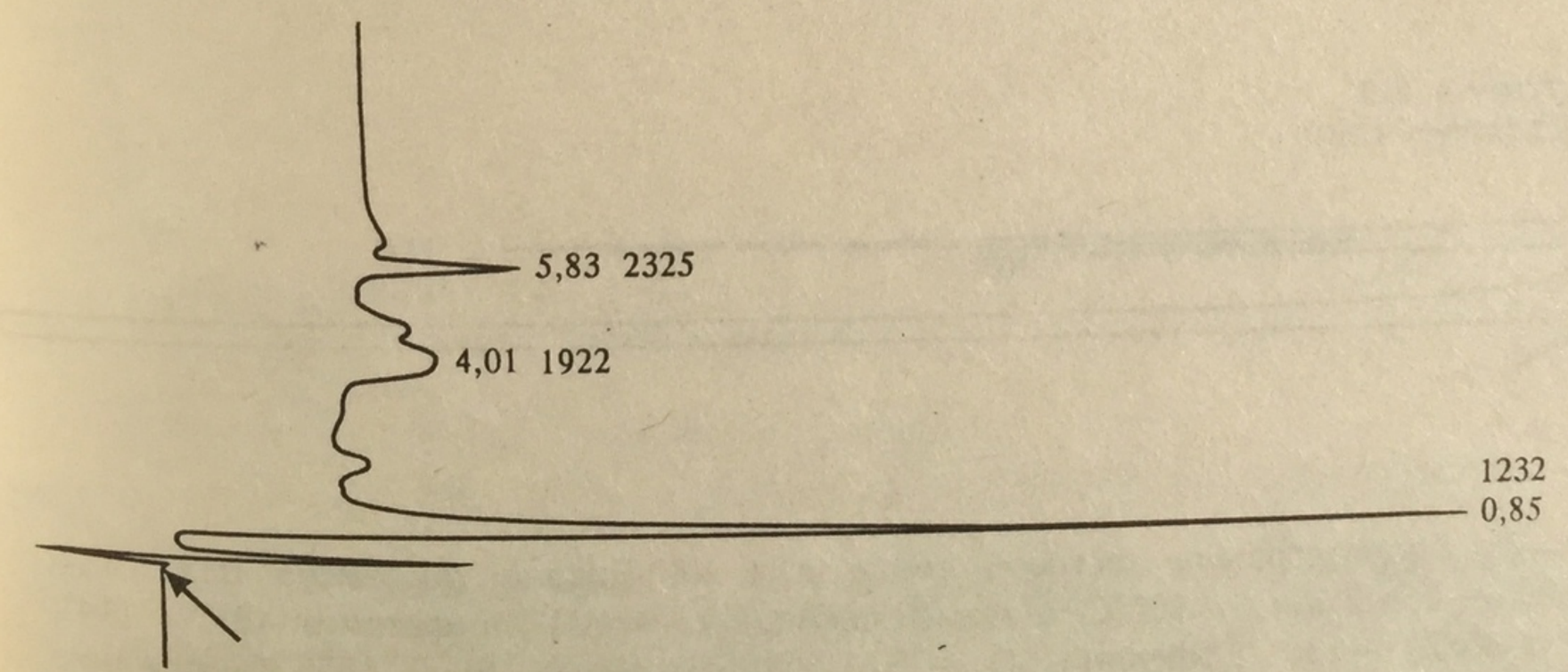


Рис. 20. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей метамфетамин (злоупотребление).x100x1. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

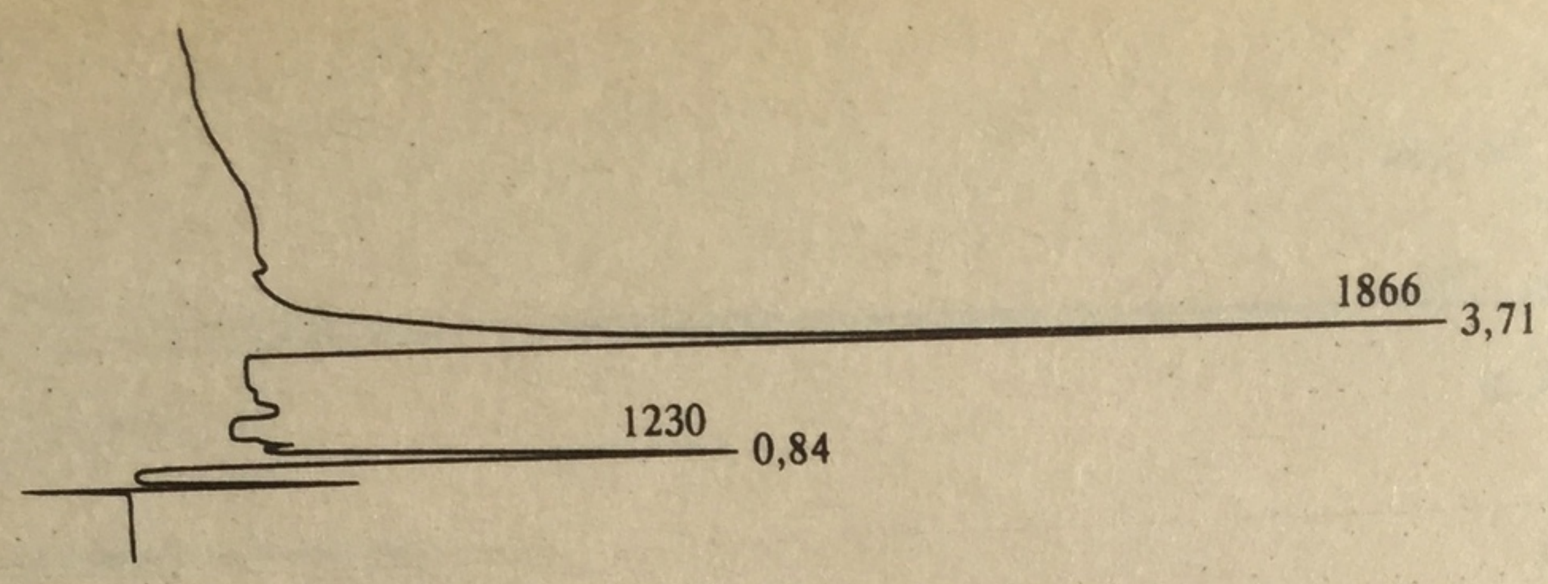


Рис. 21. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей метамфетамин (злоупотребление).x100x1. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

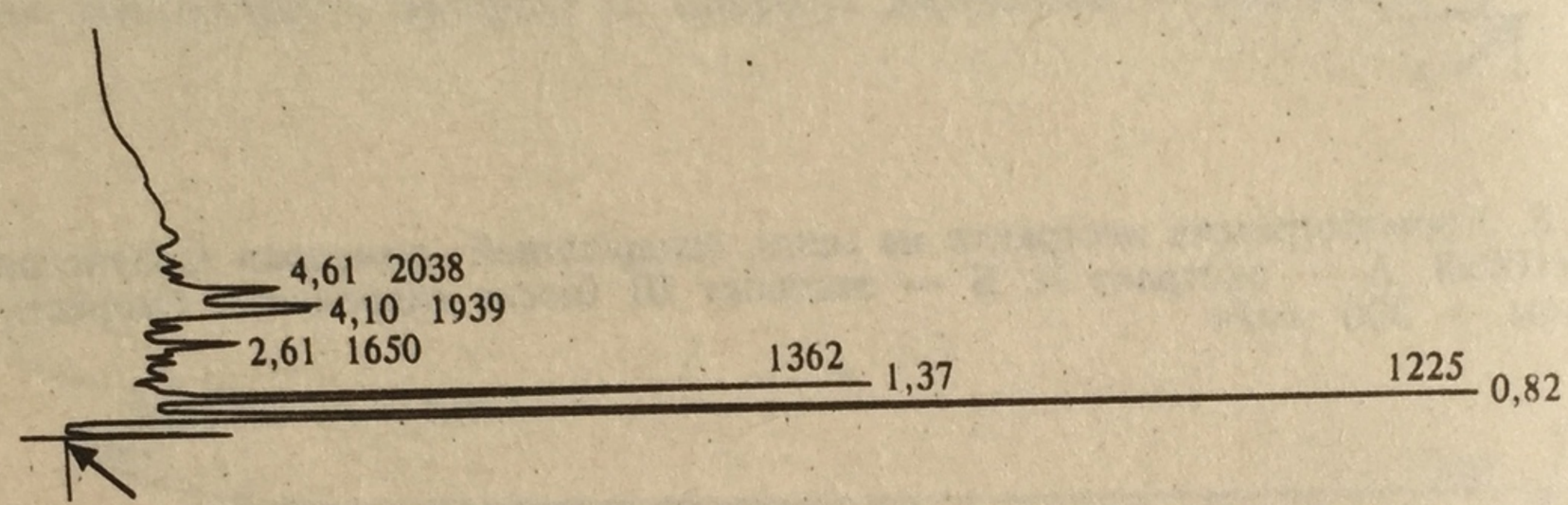


Рис. 22. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей метамфетамин, эфедрон, эфедрин (злоупотребление).x100x1. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

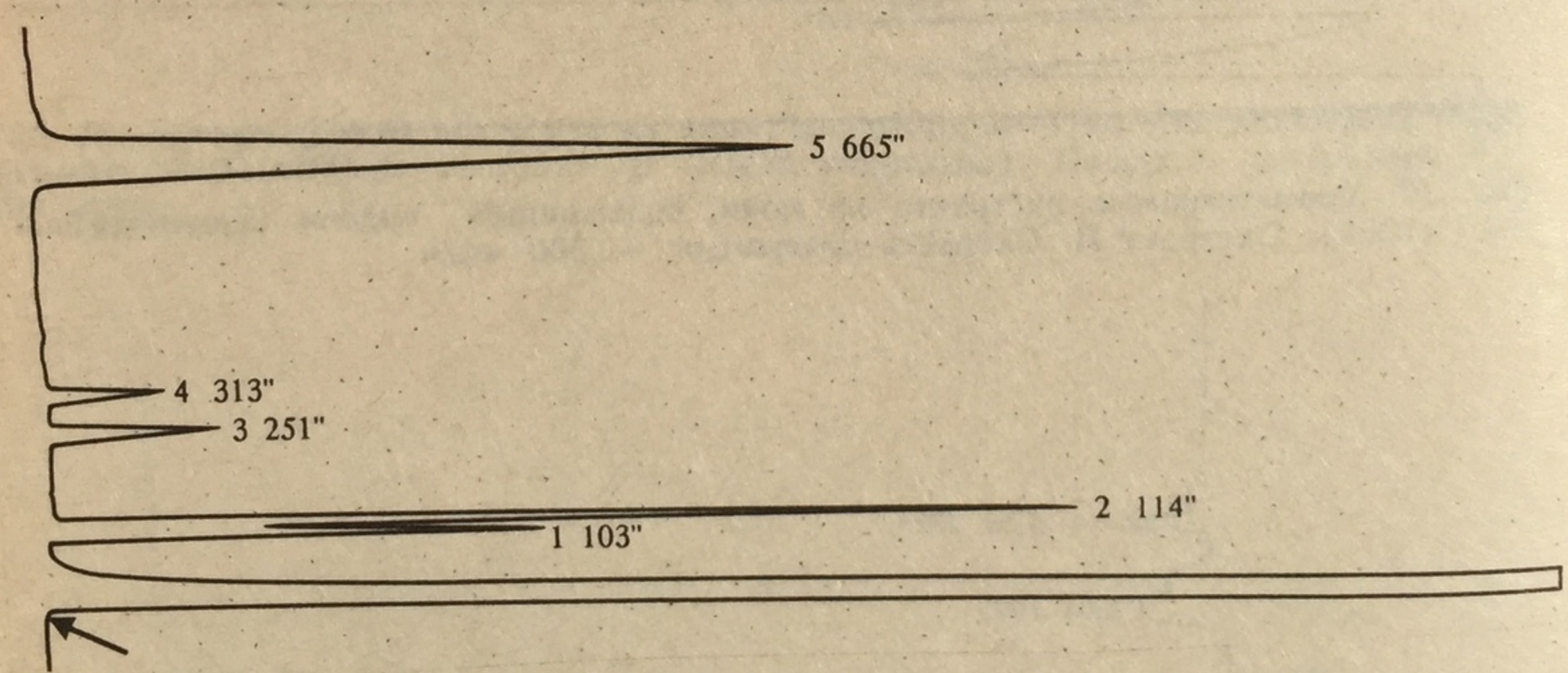


Рис. 23. Хроматограмма тестовой смеси x 1 x8 (шкала самописца ImV). $t^{\circ}_{кол}$ 130°C — 15об/мин — 200°C. Метамфетамин (1) — 103"; амфетамин (2) — 114"; эфедрон (3) — 251"; эфедрин (4) — 313"; дифениламин (5) — 665". Содержание веществ — по 100 мкг/мл, дифениламина — 300 мкг/мл. Скорость диаграммы — 0,6 см/мин

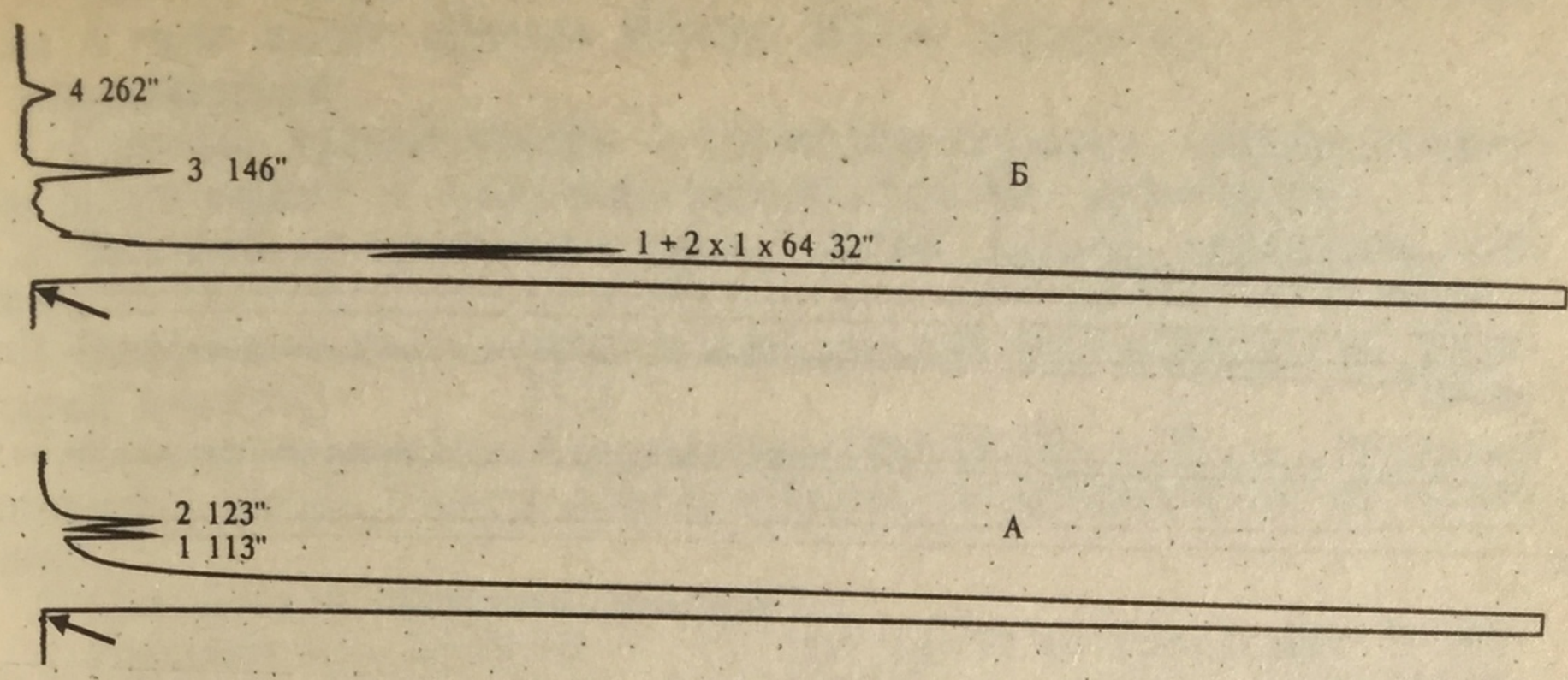


Рис. 24. Хроматограмма экстракта из мочи, содержащей метамфетамина 0,5 мкг/мл (1); амфетамина — 2,5 мкг/мл (2); эфедрона — 0,5 мкг/мл (3); эфедрина — 2 мкг/мл (4). А.$t°_{кол}$ = 130°С. Б.$t°_{кол}$ = 170°С. x 1x4 (шкала самописца ImV). Скорость диаграммы — 0,6 см/мин

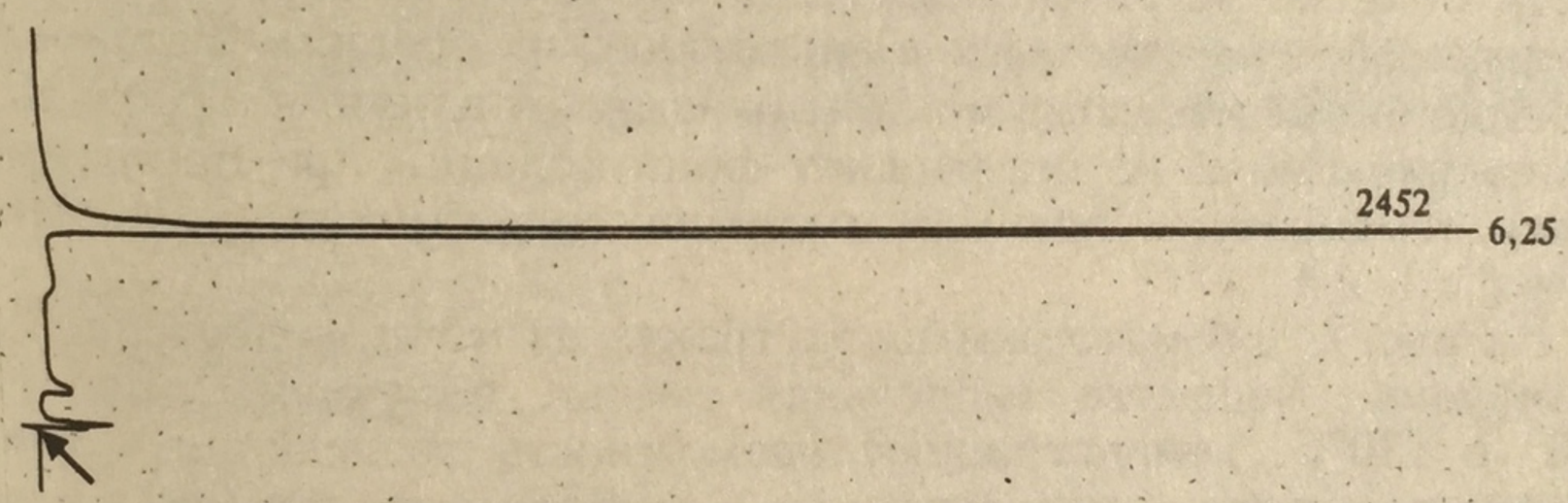


Рис. 25. Хроматограмма экстракта из мочи наркомана, содержащей 300 мкг/мл эфедрина (по данным метода поляризационной иммунофлюоресценции).x100x32. Экстракт II. Скорость диаграммы — 300 мм/ч

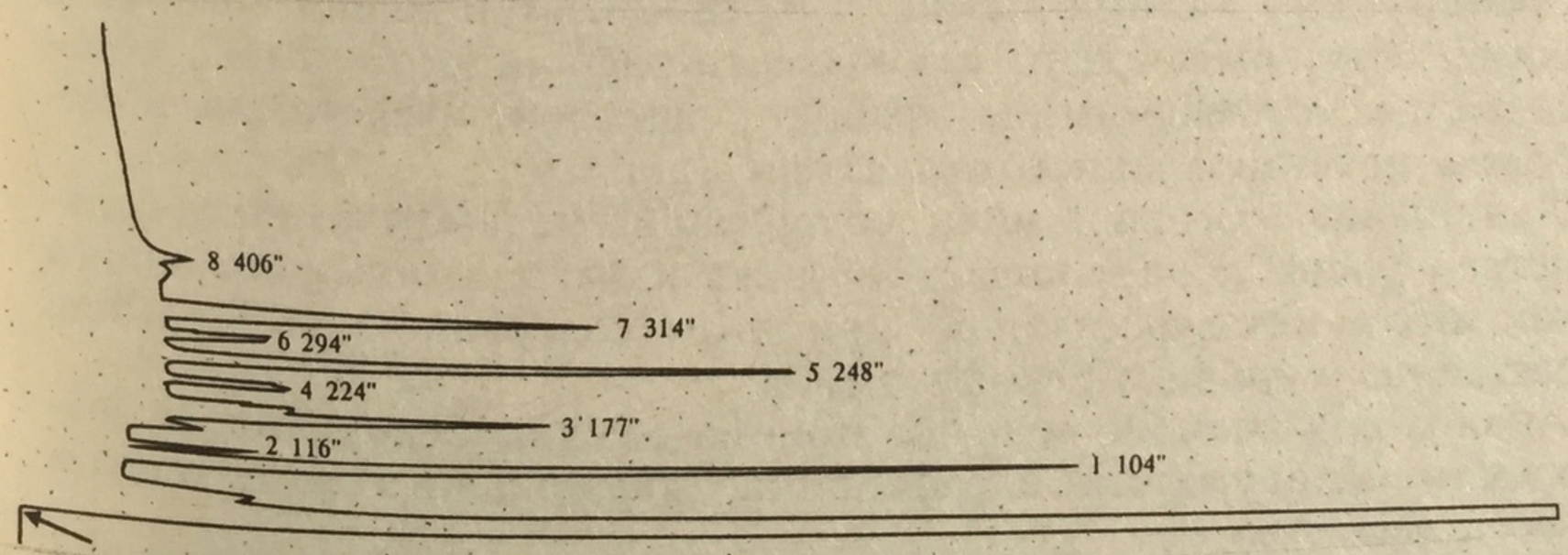


Рис. 26. Хроматограмма экстракта из мочи наркомана. Сухой остаток растворен в 100 мкл этанола. x 1x8 (шкала самописца ImV). $t°_{кол}$ 130°С — 15 об/мин — 200°С. Метамфетамин (1) — 104"; амфетамин (2) — 116"; эфедрон (5) — 248"; эфедрин (7) — 314"; неидентифицированные пики (3, 4, 6, 8) — 177, 224, 294, 406". Скорость диаграммы — 0,6 см/мин

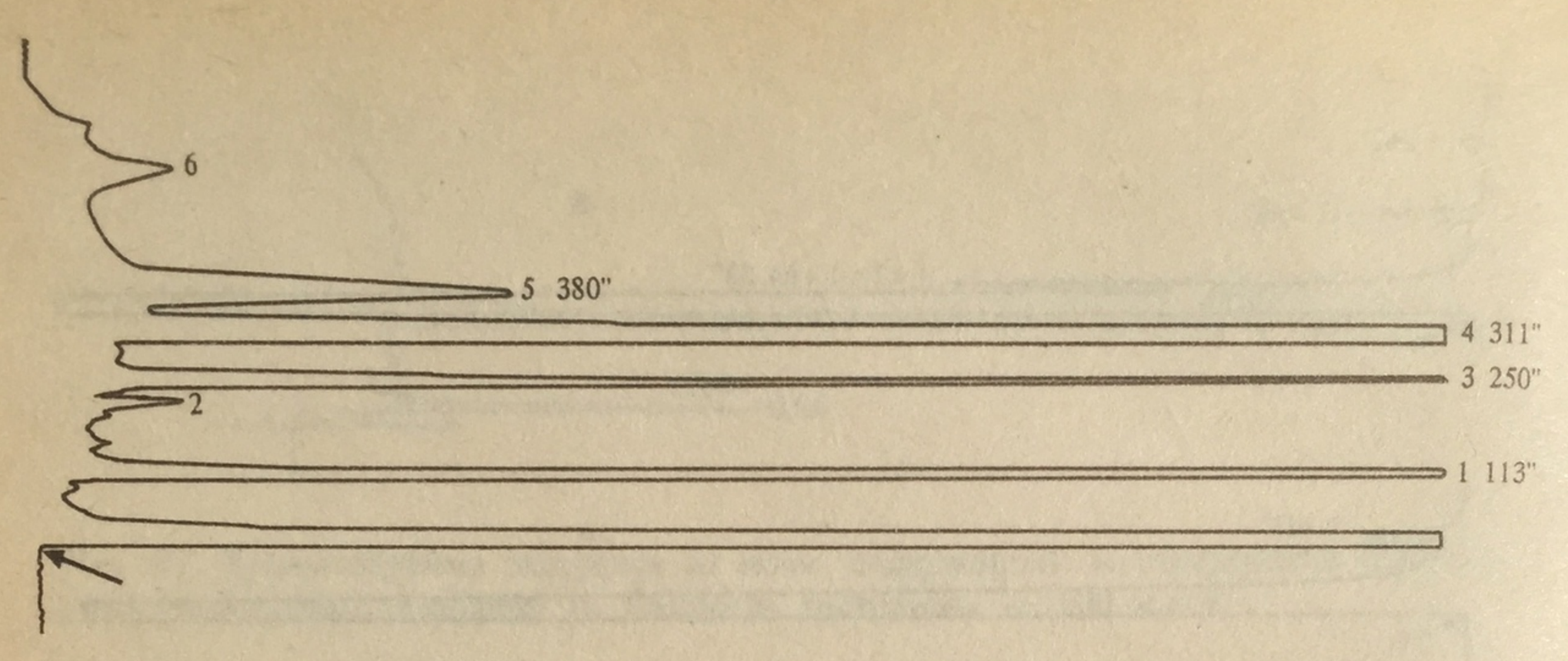


Рис. 27. Хроматограмма экстракта из мочи через 4 часа после приема 200 мг эфедрона. x1x4 (шкала самописца ImV). Амфетамин (1) — 113" (внутренний стандарт); эфедрон (3) — 250"; эфедрин (4) — 311"; норэфедрин (5) — 380"; неидентифицированные пики (2, 6). Скорость диаграммы — 0,6 см/мин

С целью изучения возможного влияния фона эндогенных веществ мочи на результаты анализа исследованы образцы мочи, не содержащей лекарственных и наркотических веществ. Установлено, что эндогенные вещества мочи не оказывают влияния на результаты идентификации и не превышают фона колонки при программировании температуры при максимальной чувствительности электрометра x 1 x 4.

На рис. 24 хроматограммы экстракта из мочи, содержащей анализируемые вещества (модельная смесь), полученные при $t^{\circ}_{кол}$= 130° и 170°С, демонстрируют возможность разделения в изотермическом режиме метамфетамина и амфетамина, эфедрина и эфедрона при их совместном присутствии.

На рис. 25 — хроматограмма экстракта из мочи наркомана, в которой предварительно методом поляризации иммунофлюоресценции обнаружены метамфетамин и эфедрин. При использовании в качестве подтверждающего газохроматографического метода обнаруживаются метамфетамин, эфедрин, эфедрон, амфетамин и метаболиты неустановленной структуры (рис. 26).

При анализе образцов мочи, содержащей метамфетамин, в большинстве случаев обнаруживается также и амфетамин, являющийся метаболитом метамфетамина. При этом содержание амфетамина существенно меньше метамфетамина.

Анализ образцов мочи после приема эфедрина показывает возможность обнаружения норэфедрина, являющегося метаболитом данного вещества.

При анализе мочи после приема эфедрона на хроматограммах обнаруживаются эфедрон, эфедрин и норэфедрин. В первые часы после приема (0,5 — 6 ч) с мочой выводятся эфедрон, эфедрин с норэфедрином. Позднее в моче обнаруживаются преимущественно эфедрин и норэфедрин.

На рис. 27 представлена хроматограмма экстракта мочи, взятой через 4 часа после приема внутрь 200 мг эфедрона.

Оборудование:

1. Газовые хроматографы с термоаэрозольным, азотно-фосфорным детекторами и пламенно-ионизационным детектором.
2. Баллоны со сжатыми газами: азотом, гелием, водородом, воздухом.
3. Колонки хроматографические стеклянные длиной 1 м, внутренний диаметр — 2 — 3 мм.
4. Стеклянные вставки в колонки длиной 50 — 70 мм с внешним диаметром менее 2 мм и воронкообразным расширением на одном конце.
5. Стекловата силанизированная.
6. Насадки для колонок — 3%-ный SE-30 на хромосорбе W-HP-80 — 100 меш, 10%-ный Карбовакс-1500 на инертоне AW-HMDS-0,16 — 0,20 мм.
7. Микрошприц на 10 мкл.
8. Секундомер.
9. Экстракционные пробирки на 20 — 25 мл.
10. Шприц одноразового использования на 5 мл.
11. Полисорб-1, фракция 0,5 — 1,0 мм.
12. Концентрационные чашки с конусным дном.
13. Краны к шприцам из тефлона или полиэтилена низкого давления.
14. Стеклянные палочки.
15. Индикаторная бумага.
16. Центрифуга.
17. Пипетки мерные.
18. Фен.
19. Бумажные фильтры.
20. Стеклянные воронки.
21. Глицериновая баня.
22. Термометры.
23. Приемники для экстрактов и элюатов.
24. Сушильный шкаф.
25. Вакуум-ловушка.

Реагенты:

1. Вода дистиллированная.
2. Этанол.
3. Эфир.
4. Хлороформ.
5. Изопропанол.
6. Ацетон.
7. Изоамиловый спирт.
8. Гексан или октан.
9. Нонан.
10. н-Алканы С10 — С32 для хроматографии.
11. Этилацетат.
12. н-бутанол.

13. Толуол.
14. Диметилдихлорсилан.
15. Метанол.
16. Аммиак 25%-ный и 10%-ный.
17. HCl-2н и концентрированная.
18. Стандарты анализируемых веществ в форме кислот и оснований.
19. Бензол.
20. NaOH гранулированный и 1 н раствор.

Все органические растворители должны быть свежеперегнанными.

Подготовка стеклянных насадочных колонок к анализу. Для удаления возможных загрязнений с внутренней поверхности колонок необходимо промыть их дистиллированной водой и органическими растворителями различной полярности в последовательности: этанол, хлороформ, ацетон, эфир (по 100 мл каждого на одну колонку). Колонки, которые ранее использовались в анализе биообразцов, перед промывкой заполнить хромовой смесью и выдержать 24 часа.

После промывки растворителями колонки промываются концентрированной HCl (100 мл) и дистиллированной водой до нейтральной реакции среды, затем метанолом. Сушат в сушильном шкафу около 2 часов при температуре 250 — 300°С и теплыми продувают инертным газом. Заполняют 10%-ным раствором диметилдихлорсилана в безводном толуоле и оставляют заполненными на сутки. Далее сливают раствор и сушат при 150°С в течение часа. Несколько раз промывают метанолом и вновь сушат при 250°С один час.

Заполнение колонки насадкой. Концы колонки оставляют незаполненными: на 2 мм конец, подсоединяемый к детектору; на 50 — 70 мм — конец, входящий в испаритель. Сорбент закрывают стекловатой слоем 2 — 3 мм.

Так как предполагается проводить анализ экстрактов из биообразцов, эндогенные вещества которых загрязняют испаритель и колонку, то следует использовать стеклянную вставку в колонку длиной 50 — 70 мм с воронкообразным расширением на одном конце для удобного ввода иглы микрошприца. По мере загрязнения вставка меняется на новую.

Стекловата и вставка должны обрабатываться диметилдихлорсиланом.

Кондиционирование насадки следует проводить без подсоединения колонки к детектору с пропусканием газа-носителя со скоростью 20 — 30 мл в минуту. В течение первого часа колонка выдерживается при 100°С. Далее температура колонки изменяется со скоростью 3 — 5 об/мин до 290°С (колонка SE-30) и до 200°С (колонка Карбовакс-1500) и выдерживается в течение 8 — 12 часов.

Вставляют колонку под самую прокладку испарителя и до упора в детектор.

ЛИТЕРАТУРА

Кислун Ю.В. Химико-токсикологический анализ лекарственных соединений. ГХ-скрининг//Сб. трудов "Современные методы химико-токсикологического анализа". М.: 1986. С. 89 — 106.

Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Л.: "Химия", 1988.

Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии. М.: "Мир", 1987.

Руководство по газовой хроматографии/Под ред. Э. Лейбница, Х.Г. Штуппе. М.: "Мир", 1988.

Гиошон Ж., Гийемен К. Количественная газовая хроматография. М.: "Мир", 1991.

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам/Под ред. О. Микеша. М.: "Мир", 1982.

Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: "Мир", 1987.

Дженнингс В., Рапп А. Подготовка образцов для газохроматографического анализа. М.: "Мир", 1986.

ГЛАВА 12

ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ

12.1. ПОДГОТОВКА ПРОБЫ МОЧИ К АНАЛИЗУ

Образец мочи (20 мл) с 4 мл концентрированной соляной кислоты (35 — 39%) выдерживают в течение 15 минут на кипящей водяной бане в сосуде с завинчивающейся крышкой. После охлаждения содержимое переносят в стакан емкостью 250 мл, добавляют твердый бикарбонат натрия до pH=8,5 — 9,0, после опадания пены раствор переливают в делительную воронку и дважды по 10 мл экстрагируют смесью хлороформ — изопропанол (9:1). Органические фазы объединяют, фильтруют через безводный Na_2SO_4 и упаривают досуха в токе теплого воздуха (лучше в токе азота при 50°С). Сухой остаток растворяют в 100 мкл подвижной фазы и анализируют.

12.1.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОСОБО ЧИСТОГО ЭКСТРАКТА

Пробу мочи после кислотного гидролиза центрифугируют при pH=9,0 — 9,3, и декантированную надосадочную жидкость экстрагируют 20 мл смеси изобутанол — метиленхлорид (1:9). Органический слой промывают 10 мл буферного раствора pH=9,0 (0,05 М калийфосфатный буфер) и подвергают реэкстракции 6 мл, 0,2 н раствора ацетата натрия с pH=1,0 (1 — 2 капли ледяной уксусной кислоты). Водную фазу доводят до pH=9,0 с помощью 3,5 мл 0,75 М раствора карбоната натрия и экстрагируют 10 мл смеси изобутанол — метиленхлорид (1:9). Органический слой упаривают досуха в токе азота при 50°С, растворяют в 100 мкл подвижной фазы и анализируют.

12.2. ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ

Для разделения алкалоидов группы опия рекомендуются следующие условия:

— хроматограф жидкостный "Милихром-2 или -4";

— хроматографическая колонка (64 x 2 мм), заполненная обращенно-фазным сорбентом марки Сепарон C_{18}, 5 мкм (колонка поставляется с хроматографом "Милихром-2");

— в качестве подвижной фазы (элюента) используют смесь 0,01 м водного раствора ацетата аммония (ЧДА, ГОСТ 3117-78) и ацетонитрила (квалификация — для жидкостной хроматографии, Харьковский завод химреактивов, ТУ 6-09-06-1092-83) (65:35);

— скорость потока элюента — 100 мкл/мин;

— детектирование опиатов проводится при длине волны 230 нм.

12.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭЛЮЕНТА И ЭТАЛОННЫХ РАСТВОРОВ СРАВНЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Первоначально готовят исходный раствор ацетата аммония в дистиллированной воде с концентрацией 0,1 М.

Для этого:

а) на аналитических весах берется навеска 0,77 г ацетата аммония;

б) навеска переносится в колбу на 100 мл, объем доводится дистиллированной водой до метки (раствор № 1), и смесь встряхивается до полного растворения осадка;

в) для приготовления 0,01 М раствора ацетата аммония (раствора № 2) 10 мл раствора № 1 переносится в мерную колбу на 100 мл и объем доводится до метки дистиллированной водой. Смесь встряхивается до полного перемешивания;

г) для приготовления элюента (подвижной фазы) в цилиндр емкостью 100 мл наливается 65 мл раствора № 2 и 35 мл ацетонитрила. Смесь встряхивается до полного перемешивания.

Для приготовления эталонных растворов сравнения анализируемых опиатов используются чистые субстанции морфина, кодеина, героина, дионина и папаверина.

Для этого:

а) на лабораторных весах взвешивается по 25 ± 1 мг морфина, кодеина, героина, дионина и 2,5 ± 1 мг папаверина;

б) навеска каждого вещества переносится в соответствующую маркированную отдельную колбу на 50 см^3 и заполняется элюентом до метки; содержимое колбы встряхивается до полного растворения осадка.

Эталонные растворы с концентрациями для морфина, кодеина, дионина, героина (0,5 мг/см^3) и раствор папаверина (0,05 мг/см^3) могут сохраняться при + 4°С в течение 3 месяцев. Эти растворы служат для идентификации указанных веществ, определения их хроматографических параметров, а также для приготовления контрольных растворов при проведении количественных анализов.

Элюент и эталонные растворы анализируемых опиатов перед использованием необходимо очистить от механических примесей (пыль из атмосферы, частицы вещества), которые могут забивать фильтры колонки и нарушать нормальную работу насоса и хроматографической колонки. Для удаления этих примесей используется владипоровская мембрана МФА-МА № 2 (ТУ 6-05-1903-84)

с размером пор 0,15 — 0,25 мкм, или мелкопористый стеклянный фильтр, или другие приспособления для ультрафильтрации. Элюент перед работой необходимо продегазировать в течение 10 минут. Для этого используется ток газообразного гелия (ТУ 51-940-80) при расходе 40 — 50 мл/мин, обработка в течение 5 минут на ультразвуковой бане или дегазация с помощью вакуумного насоса.

12.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Предел обнаружения G_{min} определяется по величине достоверно обнаруживаемого минимального аналитического сигнала (высоты пика).

За минимальную высоту пика был принят сигнал, превышающий в 5 раз уровень флюктуационных шумов (h_{min}= 2 мм × 5 = 10 мм).

Полученные данные представлены в табл. 39.

Таблица 39. **Пределы обнаружения алкалоидов опия**

Анализируемое соединение	Минимальный аналитический сигнал (h), мм	Предел обнаружения по данной методике ($G_{min} \cdot 10^{-9}$), г
Морфин	36,6	7,7
Кодеин	31,1	7,1
Дионин	27,5	19,6
Папаверин	22,5	2,9

12.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ХРОМАТОГРАФА ПО АНАЛИЗИРУЕМЫМ СОЕДИНЕНИЯМ

Определение области линейности хроматографа "Милихром-2" по анализируемым опиатам позволило установить нелинейную зависимость выходного сигнала (высоты пика h) от массы анализируемого вещества, особенно при анализе дионина.

Нелинейность по дионину составила 0,41%, по морфину — 0,19, по папаверину — 0,17, по кодеину — 0,12%. Для расчета нелинейности было взято уравнение $h = a_0 + вG$, в котором свободный член a_0 характеризует систематические погрешности ввода пробы.

Результаты градуировки хроматографа по опийным наркотикам представлены в табл. 40.

Таблица 40. **Данные градуировки хроматографа по опиатам**

Анализируемое соединение	Градуировочное уравнение $h = a_0 + вG$	
	a_0, мм	в, мм/мг
Морфин	26,6	$0,13 \cdot 10^7$
Кодеин	21,1	$0,14 \cdot 10^7$
Дионин	17,5	$0,51 \cdot 10^6$
Папаверин	12,5	$0,35 \cdot 10^7$

Таким образом, масса анализируемого опийного алкалоида рассчитывается по формуле $G = \frac{h - a_o}{в}$;

морфина $= \frac{h - 26,6}{0,13 \cdot 10^7}$; кодеина $= \frac{h - 21,1}{0,14 \cdot 10^7}$;

дионина $= \frac{h - 17,5}{0,51 \cdot 10^6}$; папаверина $= \frac{h - 12,5}{0,35 \cdot 10^7}$.

12.6. АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ ОБРАЗЦОВ СРАВНЕНИЯ

Контрольная тестовая смесь морфина, кодеина, дионина и папаверина готовится в растворе подвижной фазы.

Для приготовления контрольной смеси берутся навески морфина (4,5 ± 0,3 мг), кодеина (7±0,3 мг), дионина (10 ± 0,3 мг), папаверина (0,4 ± 0,10 мг).

Навески переносятся в колбу 50 см^3, объем доводится элюентом до метки, смесь встряхивается до полного растворения осадка, и затем полученный раствор фильтруется. Смесь должна сохраняться при температуре не выше +4°С в темноте.

Анализ контрольной смеси проводится в автоматическом режиме работы прибора. В программе параметров ДОЗ необходимо задать следующие условия:

— количество образцов — 5;
— объем ступеней для 1 и 2 — 1200;
— объем градиента — 2400.

В программе для спектрофотометрического детектора ФОТ задать следующие параметры:

— масштаб регистрации — 0,1;
— время измерения — 0,8.

Хроматограмма анализа контрольной смеси приведена на рис 28.

12.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ УДЕРЖИВАНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Тестовую смесь опиатов подвергают хроматографическому разделению в условиях эксперимента. На основании полученных величин абсолютного времени удерживания опиатов (t_R) рассчитывают следующие параметры хроматографического разделения: исправленное время удерживания ($t_R' = t_R - t_o$); коэффициенты емкости ($K' = \frac{t_R - t_o}{t_o}$); селективность разделения

$$\left(\alpha_{n+1/n} = \frac{t_{R_{n+1}} - t_o}{t_{R_n} - t_o} = \frac{K'_{n+1}}{K'_n}\right).$$

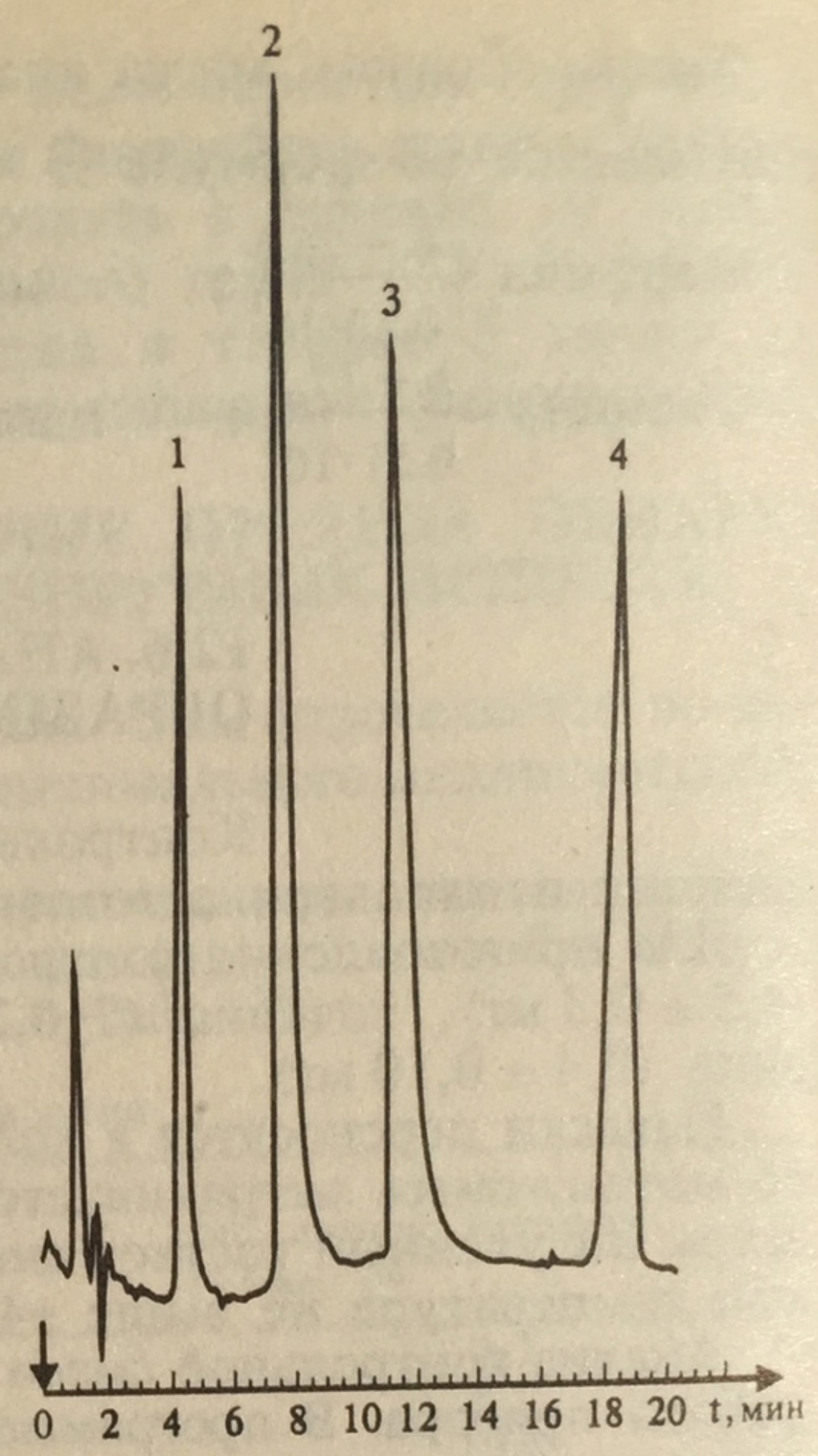


Рис. 28. Хроматографическое разделение модельной смеси: 1 — морфин, 2 — кодеин, 3 — дионин, 4 — папаверин. Колонка 64 x 2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18} (5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$ (35 : 65), скорость потока — 100 мкл/мин, скорость ленты — 5 мм/мин, масштаб регистрации — 0,1 е.о.п., объем пробы — 2 мкл

Сравнивают полученные результаты хроматографического разделения со значениями параметров, представленных в табл. 41.

Таблица 41. **Хроматографические параметры разделения опиатов**

Анализируемое соединение	Абсолютное время удерживания (t'_R)	Исправленное время удерживания (t'_R)	Коэффициент емкости (k')	Селективность разделения (α)	Относительное удерживание по морфину (t_R / t_{Rm})
Морфин	4,2	2,7	1,8	1	1
Кодеин	7,5	6,0	4,0	2,2	2,2
Дионин	11,2	9,7	6,5	1,6	3,6
Папаверин	18,3	16,8	11,0	1,7	6,2

Значения коэффициентов емкости (k') и селективности разделения ($\alpha_{n+1/n}$) не должны отличаться от табличных более чем на 30%. Необходимо помнить, что для одной и той же колонки в одних и тех же условиях эксперимента коэффициенты емкости и селективности разделения не должны варьировать от анализа к анализу. Основным фактором, влияющим на изменение этих параметров, может являться нарушение состава подвижной фазы. В случае непостоянства значений хроматографических параметров (или значительного отклонения от табличных данных) необходимо

проверить правильность приготовления подвижной фазы и далее, если не наступит улучшения результатов, сменить колонку. После этого необходимо повторить операции по определению параметров удерживания.

Эффективность хроматографической колонки, характеризующая разрешающую способность колонки, определяется по формуле

$$N = 5{,}545 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega_{0,5}}\right)^2,$$

где $\omega_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты (мм).

Степень хроматографического разделения, характеризующая качество разделения двух веществ, определяется по формуле

$$R_s = \frac{t_{R_{n+1}} - t_{R\,n}}{\omega_{0,5_{n+1}} - \omega_{0,5\,n}},$$

где $t_{R_{n+1}} - t_{R_n}$ — разность времени удерживания разделяемых соседних веществ (мм).

При значительном изменении указанных параметров, что проявляется в ухудшении разделения пиков, возникновении хвостов пиков и резком уменьшении или увеличении времени удерживания компонентов, необходима регенерация колонки. Для этой цели рекомендуется промывка колонки следующим рядом растворителей в такой последовательности: вода, диметилсульфоксид, метанол, хлороформ, смесь изопропанол-вода. Если в результате регенерации не удалось восстановить работоспособность колонки, ее следует заменить новой.

12.8. АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ НА СОДЕРЖАНИЕ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ

12.8.1. Качественный анализ биопробы

Идентификация опиатов, содержащихся в экстрактах мочи, проводится с использованием информации об удерживании — объеме или времени удерживания веществ сравнения — метчиков. При совпадении t_R или V_R метчика с соответствующими хроматографическими параметрами пика вещества на хроматограмме делается предположение об идентичности метчика и вещества. Для большей надежности идентификации проводят анализ смесевой пробы: к анализируемой пробе экстракта из мочи добавляют сопоставимый по концентрации и объему дозы "контрольный" раствор вещества сравнения (предполагаемого опиата) в подвижной фазе. При идентичности вещества на хроматограмме в месте выхода пика предполагаемого вещества появляется увеличенный по высоте пик. При несовпадении времени удерживания "предполагаемого" и "контрольного" наркотиков на хроматограмме появляются два пика с

разной степенью хроматографического разделения. Возможно появление одного чрезмерно уширенного пика. В этом случае проводят регистрацию хроматограммы при двух длинах волн, чтобы по спектральным отношениям удостовериться в идентичности (или в неидентичности) "предполагаемого" и "контрольного" наркотиков.

На рис. 29 представлена хроматограмма экстракта контрольной мочи, не содержащей наркотических веществ. На рис. 30 — 32 представлены хроматограммы анализа экстрактов мочи пациентов наркологической клиники, подозреваемых в злоупотреблении опиатами.

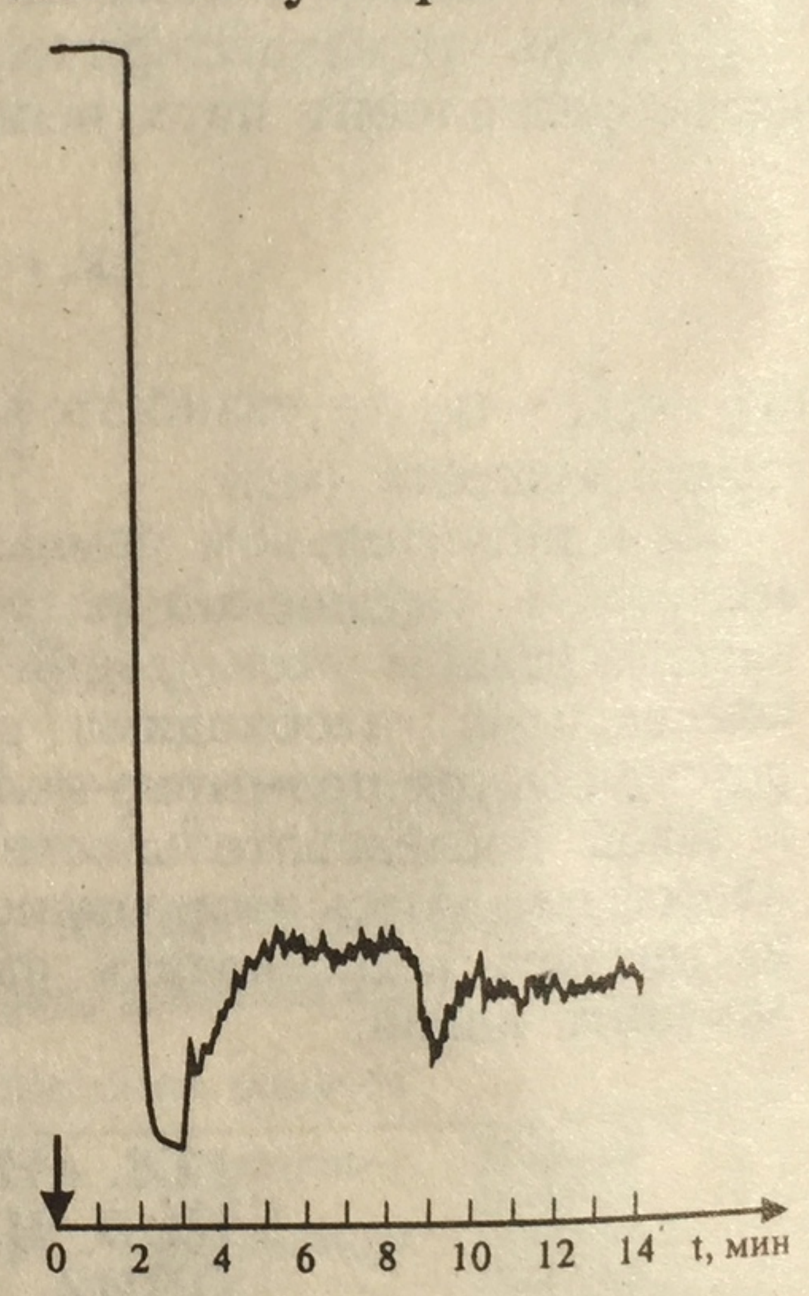


Рис. 29. Хроматограмма экстракта мочи, не содержащей наркотических веществ. Колонка 64x2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18} (5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$, скорость потока — 100 мкл/мин, скорость ленты — 5 мм/мин, масштаб регистрации — 0,05 е.о.п., объем пробы — 2 мкл

Идентификация наркотических веществ проводится путем сопоставления времени удерживания и коэффициентов емкости определяемых компонентов и образцов сравнения индивидуальных опиатов, а также методом добавок предполагаемого наркотического вещества в раствор экстрактов мочи.

На рис. 33 приведена хроматограмма анализа экстракта из мочи пациента до и после добавки в раствор известного количества морфина.

12.8.2. Количественный анализ

Для оценки количественного содержания опиатов в моче человека можно использовать различные методы, в том числе метод добавки, метод внешнего стандарта, метод внутреннего стандарта и т. д.

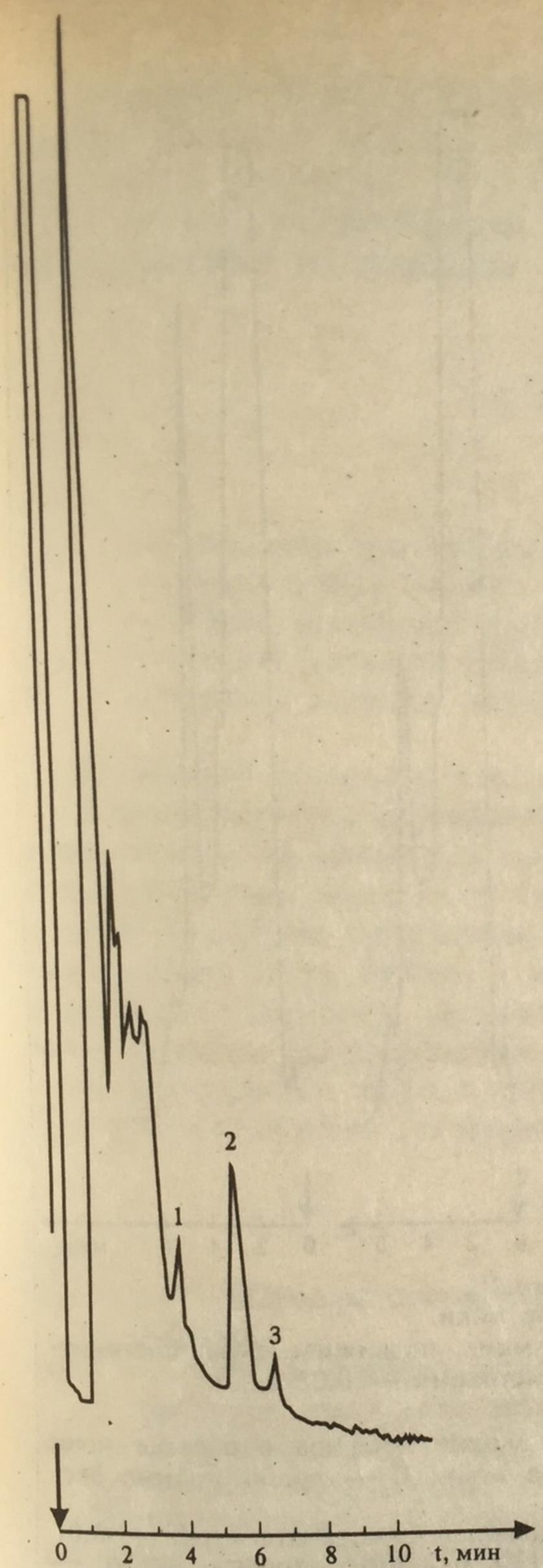


Рис. 30. Хроматограмма экстракта мочи больного И.
1 — неидентифицированный пик
2 — морфин, 3 — кодеин,
Колонка 64 x 2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18} (5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$ (35 : 65), скорость потока — 100 мкл/мин, скорость ленты — 5 мм/мин, масштаб регистрации — 0,05 е.о.п., объем пробы — 2 мкл

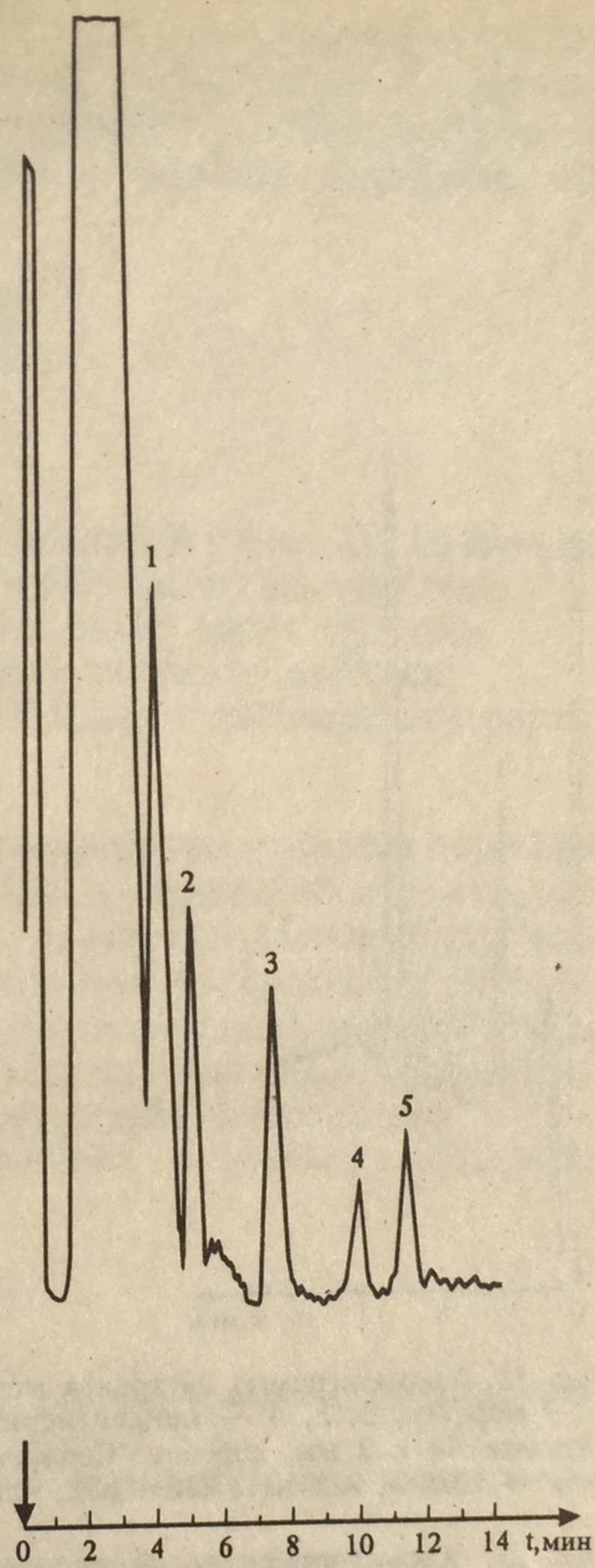
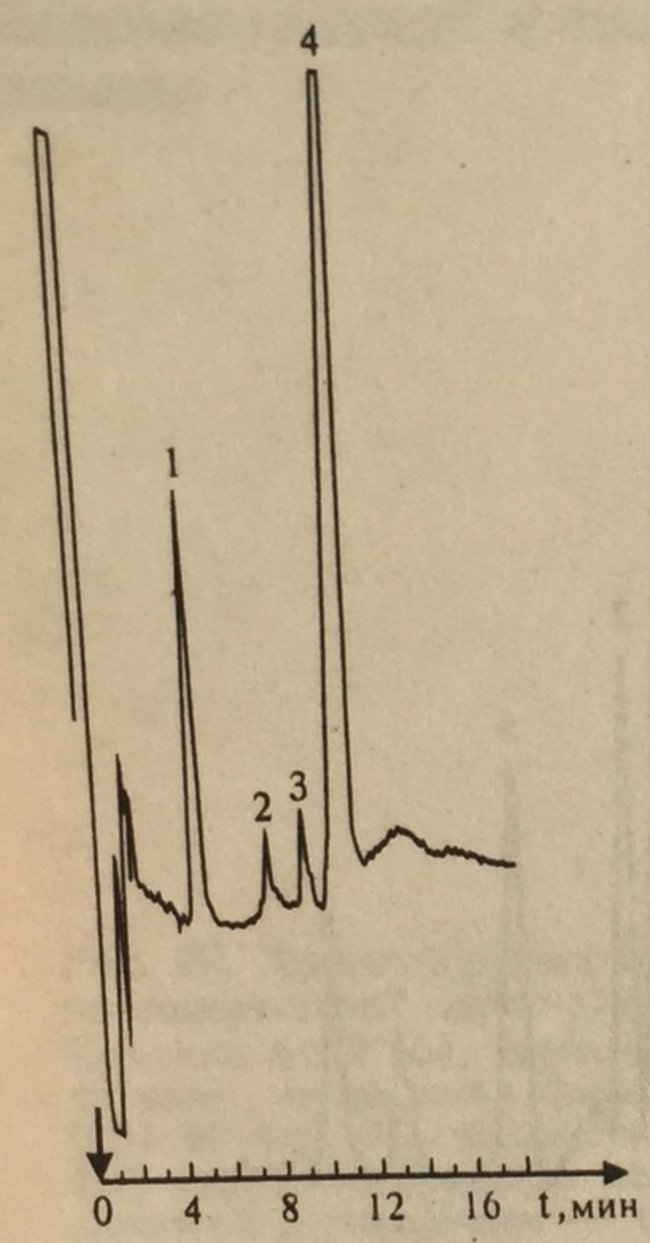


Рис. 31. Хроматограмма экстракта мочи больного № 10607.
2 — морфин, 3 — кодеин, 1, 4, 5 — неидентифицированные пики.
Колонка 64 x 2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18} (5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$ (35 : 65), скорость потока — 100 мкл/мин, скорость ленты — 5 мм/мин, масштаб регистрации — 0,05 е.о.п., объем пробы — 5 мкл



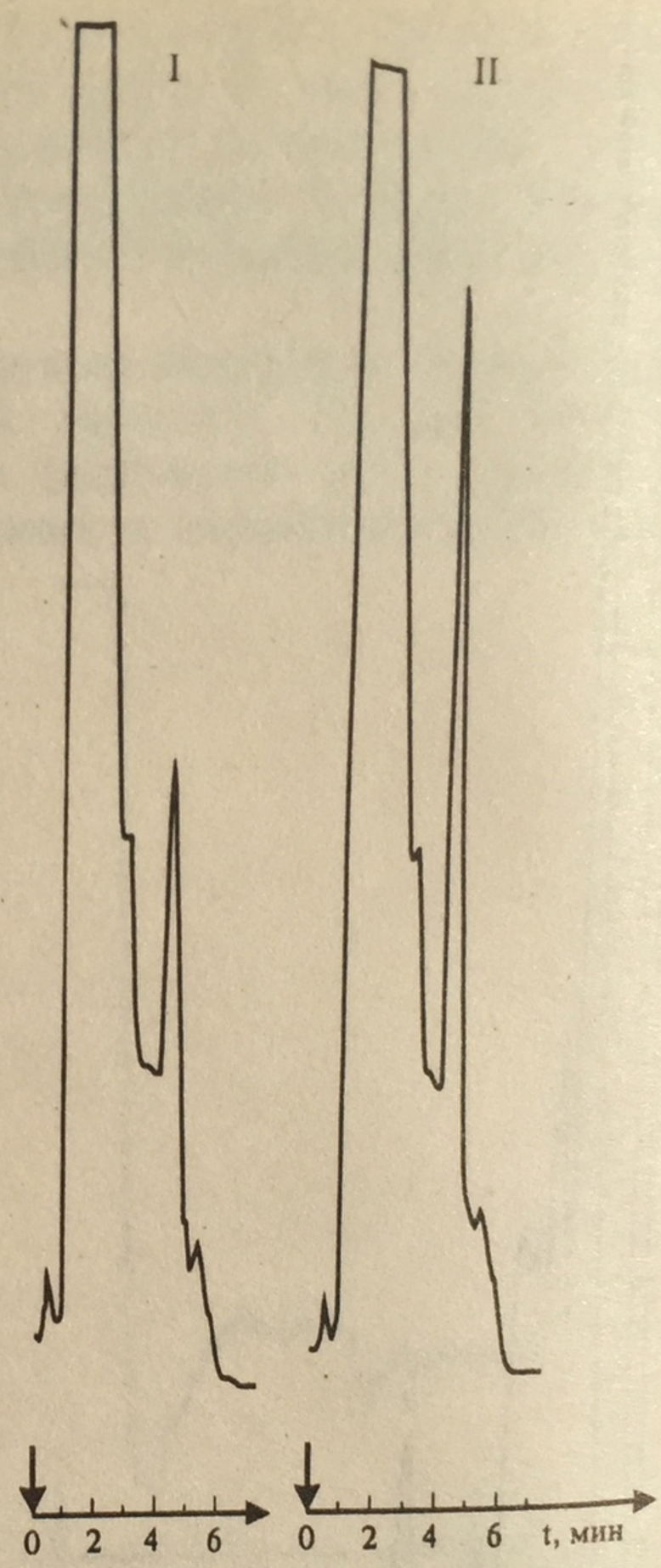


Рис. 32. Хроматограмма экстракта мочи больного Г.
1 — морфин, 2, 3, 4 — неидентифицированные пики.
Колонка 64 x 2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18} (5 мкм), подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$ (35 : 65), масштаб регистрации — 0,05 е.о.п.

Рис. 33. Хроматографический количественный анализ морфина в образце мочи методом добавки: I — хроматограмма экстракта мочи, II — хроматограмма экстракта мочи с добавкой морфина.
Колонка 64 x 2 мм, сорбент "Сепарон" C_{18}, подвижная фаза: ацетонитрил — 0,01 М $AcONH_4$ (35 : 65), скорость потока — 100 мкл/мин, скорость ленты — 3 мм/мин, масштаб регистрации — 0,2 е.о.п., объем пробы —6 мкл

а) *Метод добавки*

В соответствии с принципами метода добавки проводят анализ реальной пробы (экстракта мочи) и той же самой пробы (экстракта мочи) с добавкой в нее раствора известной концентрации одного из компонентов, определенных с помощью качественного анализа (см. ранее).

Например, сухой остаток экстракта мочи растворяют в определенном объеме подвижной фазы (0,5 мл) и добавляют 0,2 мл контрольного раствора сравнения морфина с концентрацией 0,110 мг/мл. Концентрация морфина в растворе экстракта (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{\frac{C_g \cdot V_g}{V_i + V_g}}{\frac{h_{g+i}}{h_i} - 1},$$

где

C_g — концентрация морфина в контрольной смеси (0,110 мг/мл);
V_g — объем добавленного контрольного раствора (0,2 мл);
V_i — объем исходного раствора экстракта мочи (0,5 мл);
h_{g+i} — высота сигнала морфина после введения добавки;
h_i — высота сигнала морфина в исходном растворе экстракта.

б) *Метод внешнего стандарта*

В соответствии с методом внешнего стандарта, с учетом линейной зависимости выходного сигнала от массы вещества последовательно с анализом экстракта мочи проводят анализ контрольного раствора соответствующего наркотика. Концентрация контрольного раствора (C_k) должна быть близка к концентрации определяемого вещества в растворе экстракта. Анализы контрольного раствора и экстракта мочи должны проводиться в одном масштабе регистрации.

Концентрация определяемого вещества в растворе экстракта (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_k \cdot h_i}{h_k},$$

где

C_k — концентрация контрольного раствора наркотического вещества;
h_i — высота сигнала определяемого наркотического вещества в растворе экстракта мочи;
h_k — высота пика вещества контрольного раствора.

в) *Метод внутреннего стандарта*

В соответствии с методом внутреннего стандарта к пробе мочи до операции пробоподготовки добавляется известное количество вещества, принятого за стандарт. В анализе опийных алкалоидов в качестве внутренних стандартов рекомендуется использовать одно из следующих веществ: налорфин, налоксон, дигидроморфинон или другие вещества, которые в данных условиях хроматографического разделения полностью отделяются от других компонентов образца, элюируют близко к пику анализируемого соединения, не реагируют с другими компонентами, т.е. удовлетворяют требованиям, предъявляемым к внутреннему стандарту. Можно использовать одновременно два и более внутренних стандарта.

Концентрация определяемого вещества рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_{вс} \cdot h_i}{h_{вс}} \cdot \frac{1}{F_{C_i/C_{вс}}},$$

где:

C_i — концентрация определяемого вещества;

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта;

h_i — высота пика (или площадь — S_i) определяемого вещества;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь — $S_{вс}$) стандарта;

$F_{C_i/C_{вс}}$ — относительный калибровочный фактор.

Относительный калибровочный фактор компонента $F_{C_i/C_{вс}}$ вычисляется по формуле

$$F_{C_i/C_{вс}} = \frac{h_i \cdot C_{вс}}{C_i \cdot h_{вс}},$$

где

h_i — высота пика (или площадь) компонента известной концентрации (калибровочный раствор);

C_i — концентрация калибровочного раствора определяемого компонента;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) внутреннего стандарта;

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта.

12.9. СНЯТИЕ УФ-СПЕКТРА

а) Для снятия УФ-спектра опиатов в процессе хроматографического анализа включить прибор в автоматическом режиме с изменением в программе для спектрофотометрического детектора:

Число длин волн — 1
Длина волн — 230 000 000 000 000
Из них на экран — 190 360
Границы спектра — 190 360
Масштаб регистрации — 0,1
Время измерения — 0,8

б) Когда на экране появится пик, спектр которого вы хотите снять, нажмите клавишу "А" (стоп). Этим вы остановите работу насоса.

в) Следите за показаниями оптической плотности. Когда они перестанут меняться (через 20 — 40 с), нажмите клавишу "В" (спектр). На экране начинается развертка спектра.

г) Установите скорость диаграммной ленты — 1800 мм/ч.

д) При необходимости загрубите масштаб регистрации.

е) После записи спектра остановите развертку спектра клавишей " В"; включите насос клавишей " А". Хроматограмма продолжается.

На рис. 34 приведен спектр кодеина в растворе подвижной фазы.

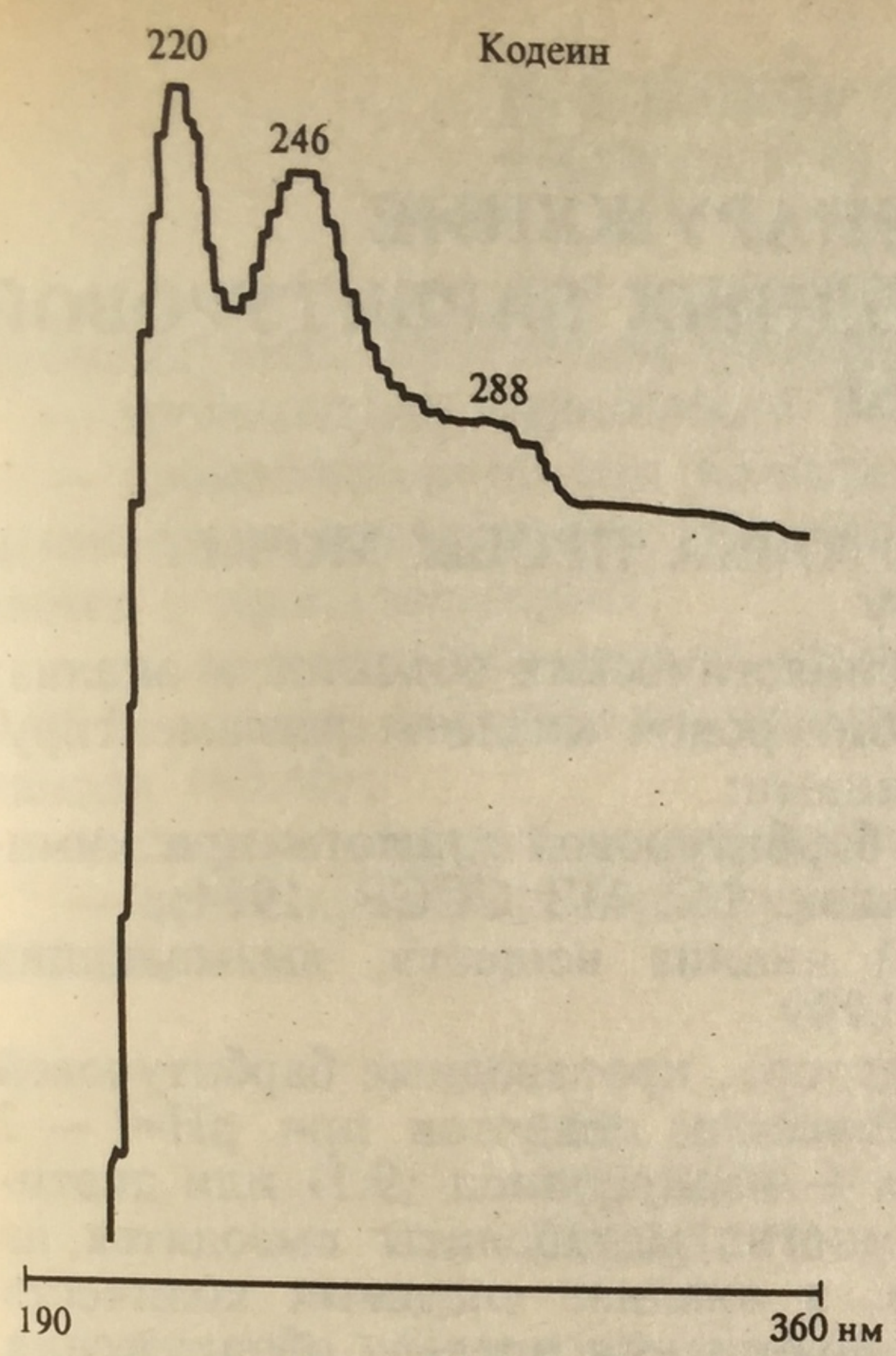
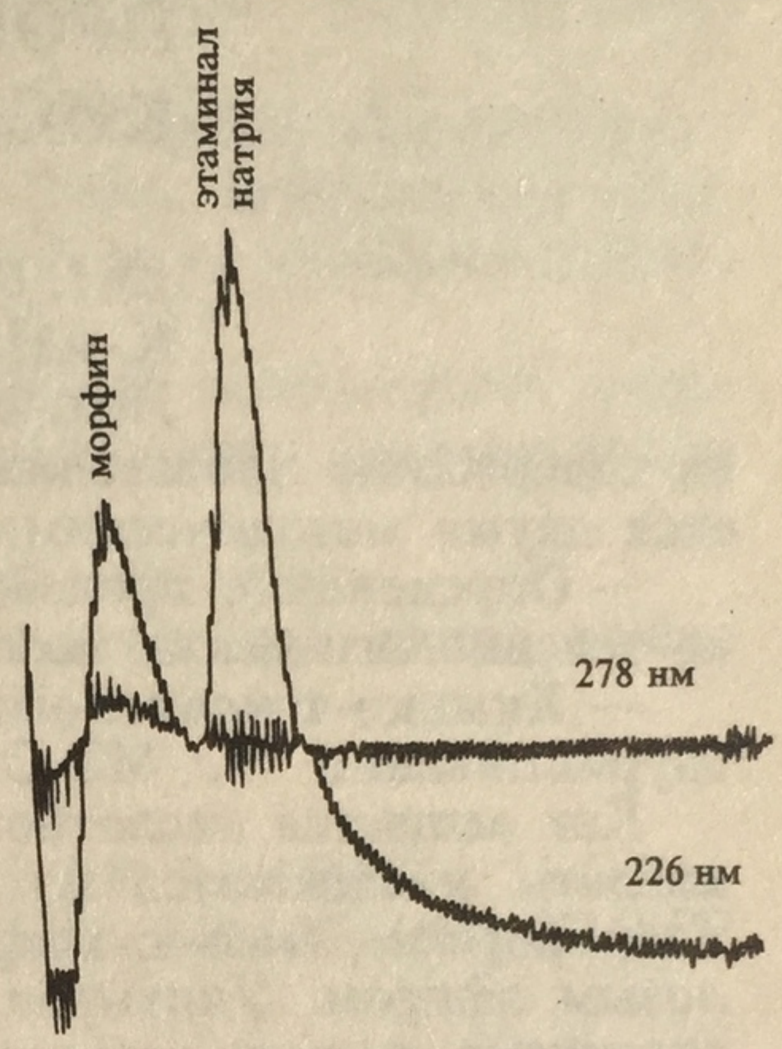


Рис. 34. УФ-спектр кодеина

Рис. 35. Хроматографическое разделение морфина и этаминала натрия, записанное при двух длинах волн



12.10. АНАЛИЗ СМЕСИ ПРИ ДВУХ ДЛИНАХ ВОЛН

а) Включите прибор и задайте режим для спектрофотометрического детектора ФОТ:

Число длин волн — 2
Длина волн — 230 260 000 000 000
Из них на экран — 230 260
Границы спектра — 000 000
Масштаб регистрации — 0,1
Время измерения — 0,8

б) Следите за процессом по экрану и по самописцу. На экране выдаются значения оптических плотностей в данный момент на двух длинах волн — 230 и 260 мм. На рис. 35 представлено хроматографическое разделение морфина и этаминала натрия при двух длинах волн.

ГЛАВА 13

ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

13.1. ПОДГОТОВКА ПРОБЫ МОЧИ К АНАЛИЗУ

Подготовка биологических объектов к анализу на содержание производных барбитуровой кислоты регламентируется двумя методическими изданиями:

— Определение производных барбитуровой кислоты при химико-токсикологических исследованиях. М.: МЗ СССР, 1974;

— Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. М.: МЗ СССР, 1989.

Как вещества кислотного характера, производные барбитуровой кислоты извлекаются из биологических объектов при pH=1 — 2 хлороформом, смесью хлороформ — изопропанол (9:1) или диэтиловым эфиром. Учитывая, что многие метаболиты выводятся из организма в виде глюкуронидов, в анализе следовых количеств барбитуратов рекомендуется для повышения предела обнаружения метаболитов проведение предварительного кислотного гидролиза биологических объектов с последующей жидкость-жидкостной экстракцией.

Степень извлечения производных барбитуровой кислоты по вышеназванным методическим указаниям достаточно высока и находится в пределах 90 — 100%.

Что касается сохраняемости барбитуратов в трупном, загнившем материале, необходимо отметить, что соединения данной группы достаточно стабильны (табл. 42) при низкой степени извлечения.

Таблица 42. **Сохраняемость барбитуратов в трупном материале**

Вещество	Процент обнаружения в гнилостном материале		
	Срок хранения		Модельный опыт (40 мкг вещества добавлено к 100 г объекта)
	1 месяц	6 месяцев	
Барбитал	1,8 — 2,2	3,3 — 3,2	6,16 — 8,78
Фенобарбитал	15,8 — 16,0	14,7 — 15,8	16,5 — 21,5
Барбамил	21,0 — 25,6	20,6 — 23,0	24,0 — 25,6
Этаминал натрия	20,6 — 22,7	19,8 — 20,7	22,5 — 28,6

13.2. ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ БАРБИТУРАТОВ

Для разделения барбитуратов методом ВЭЖХ рекомендуются следующие условия:

— хроматограф жидкостный "Милихром" (любой модификации);

— хроматографическая колонка (62 × 2мм), заполненная обращенно-фазным сорбентом "Сепарон" C_{18} (5 мкм) (колонка поставляется с хроматографом);

— в качестве подвижной фазы (элюента) используется смесь 0,05 М водного раствора двухзамещенного фосфата аммония и метанола (60:40);

— скорость потока элюирования — 100 мкл/мин;

— детектирование барбитуратов проводится при длине волны 240 нм.

13.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭЛЮЕНТА И ЭТАЛОННЫХ РАСТВОРОВ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

а) В мерной посуде готовится раствор $(NH_4)_2HPO_4$ в дистиллированной воде — 0,5 М (раствор № 1). Для этого:

— на аналитических весах берется навеска 0,66 г $(NH_4)_2HPO_4$;

— навеска переносится в колбу на 100 мл, объем доводится дистиллированной водой до метки, и смесь встряхивается до полного растворения осадка.

б) Для приготовления 0,05 М раствора $(NH_4)_2HPO_4$ 10 мл раствора № 1 переносится в мерную колбу на 100 мл, и объем доводится до метки дистиллированной водой (раствор № 2). Смесь встряхивается до полного перемешивания.

в) Для приготовления эталонных растворов сравнения анализируемых барбитуратов используются чистые субстанции барбитала, фенобарбитала, циклобарбитала, барбамила и этаминала натрия. Для этого:

— на лабораторных весах взвешивается по 25 ± 1 мг барбитала, фенобарбитала, циклобарбитала, барбамила и этаминала натрия;

— навеска каждого вещества переносится в соответствующую маркированную отдельную колбу на 50 мл и заполняется элюентом до метки; содержимое колбы встряхивается до полного растворения осадка.

Эталонные растворы сравнения анализируемых барбитуратов могут сохраняться при + 4°С в течение 3 месяцев. Эти растворы служат для идентификации указанных веществ, определения их хроматографических параметров, а также для приготовления контрольных растворов при проведении количественных анализов.

Элюенты и эталонные растворы перед использованием необходимо очистить от механических примесей (пыль из атмосферы, частицы вещества), которые могут забивать фильтры колонки и нарушать нормальную работу насоса и хроматографической колонки. Для удаления этих примесей используется владипоровская мембрана МФЦ № 2 (ТУ-6-05-1978-84) с размером пор 0,15 — 0,25 мкм или мелкопористый стеклянный фильтр. Элюент перед работой необходимо продегазировать в течение 10 минут. Для этого используется ток газообразного гелия (ТУ-51-940-80) при расходе 40 — 50 мл/мин, обработка на ультразвуковой бане или вакуумный насос.

13.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХРОМАТОГРАФА И ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Градуировка хроматографа проводится по фенобарбиталу, барбамилу и этаминалу натрия. Серии контрольных растворов этих веществ готовятся в подвижной фазе в диапазоне концентраций 0,03 — 1,0 мг/мл. По результатам анализа для каждого вещества строятся градуировочные графики зависимости высоты хроматографического пика (h, мм) от содержания веществ в пробе (G, мг), где $G = C \cdot Vg$; C — концентрация анализируемого вещества, мг/мл; V_g — объем вводимой дозы, мкл.

Значения градуировочных коэффициентов (K, мм/мг) для фенобарбитала, барбамила, этаминала натрия в соответствии с градуировочной характеристикой $h = K \cdot G$ были рассчитаны методом наименьших квадратов.

Результаты градуировки хроматографа "Милихром-2" приведены в табл. 43.

Таблица 43. **Значения градуировочного коэффициента для определяемых барбитуратов**

Вещество	Градуировочное уравнение ($h = K \times G$)
	$K \times 10^5$, мм/мг
Фенобарбитал	7,6
Барбамил	2,0
Этаминал натрия	1,7

Предел обнаружения (G_{min}, мг) рассчитывается по величине такого количества вещества, которое вызывает сигнал, превышающий в 5 раз уровень флюктуационных шумов, который на шкале чувствительности, равной 0,1 е.о.п. (единиц оптической плотности), составляет 2 мм. Отсюда минимальное значение сигнала h_{min} = 2 мм × 5. Значения пределов обнаружения фенобарбитала, барбамила и эта-

минала натрия, рассчитанные по формуле $G_{min} = \frac{h_{min}}{K}$, приведены в табл. 44.

Таблица 44. **Пределы обнаружения барбитуратов**

Вещество	Предел обнаружения ($G_{min} \times 10^{-5}$, мг)
Фенобарбитал	1,3
Барбамил	5
Этаминал натрия	6

13.5. АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ БАРБИТУРАТОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАРАМЕТРОВ УДЕРЖИВАНИЯ

Контрольная модельная смесь барбитала, фенобарбитала, циклобарбитала, барбамила и этаминала натрия готовится в растворе подвижной фазы. Для этого:

а) берутся навески барбитала (10 ± 0,5 мг), фенобарбитала (12 ± 0,5 мг), циклобарбитала (22 ± 0,5 мг), барбамила (21 ± 0,5 мг), этаминала натрия (35 ± 0,5 мг);

б) навески переносятся в колбу 50 $см^3$, объем доводится до метки, смесь встряхивается до полного растворения и фильтруется. Смесь должна сохраняться при + 4°С в темноте.

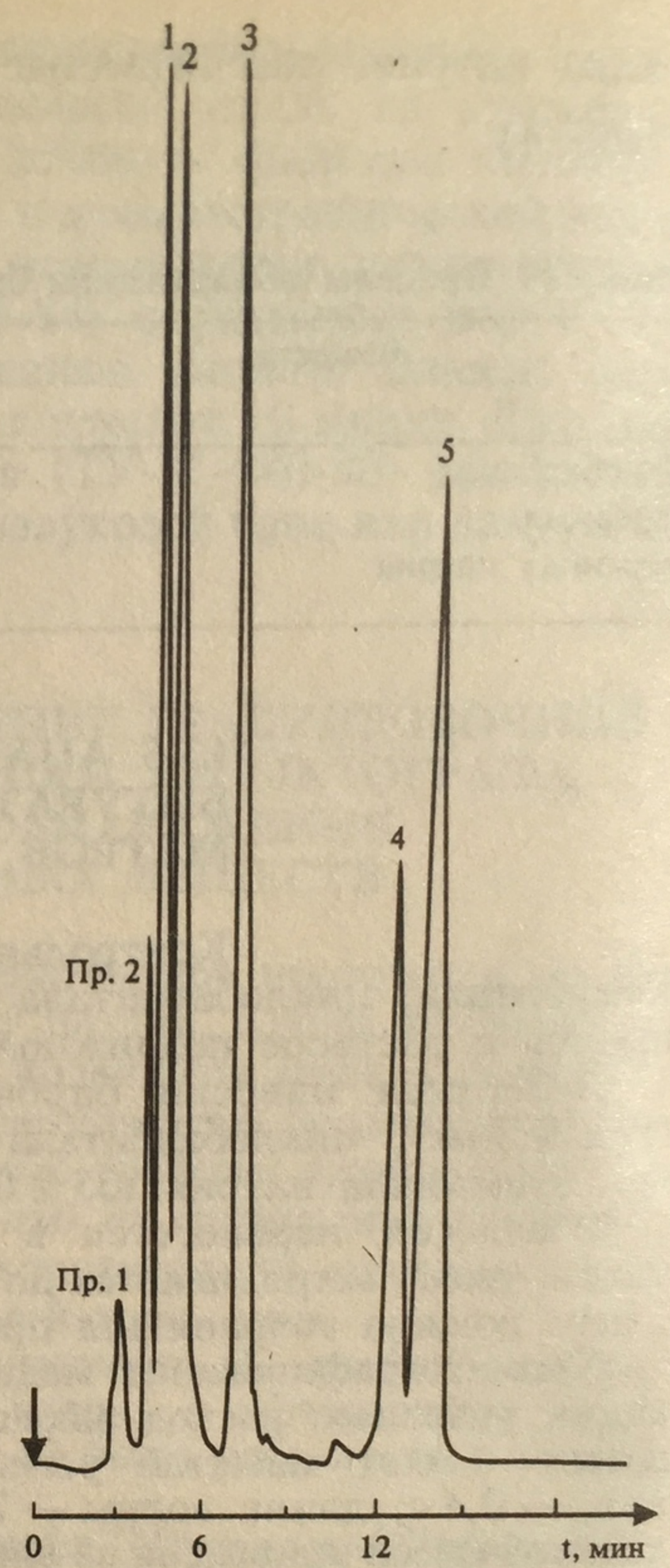
Хроматографирование модельной смеси проводится при следующих условиях: расход элюента — 100 мкл/мин; объем вводимой дозы — 4 мкл; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; время измерения — 0,4 с; длина волны — 240 нм. Хроматограмма анализа модельной смеси приведена на рис. 36, а основные хроматографические параметры — в табл. 45.

Таблица 45. **Хроматографические параметры модельной смеси барбитуратов**

Вещество	Объем удерживания (V_R), мкл	$K' = \frac{V_R - V_o}{V_o}$
Барбитал	379	1,65
Фенобарбитал	444	2,11
Циклобарбитал	498	3,48
Барбамил	1005	7,03
Этаминал натрия	1111	7,77

Примечание. V_R — объем удерживания, мкл; V_o — объем удерживания несорбируемого вещества (нитрат натрия) составляет 143 мкл.

Рис. 36. Хроматограмма анализа модельной смеси барбитала (1), фенобарбитала (2), циклобарбитала (3), барбамила (4) и этаминала натрия (5). "Милихром-2"; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п., величина дозы — 4 мкл; пр. 1 и пр. 2 — неидентифицированные примеси в циклобарбитале



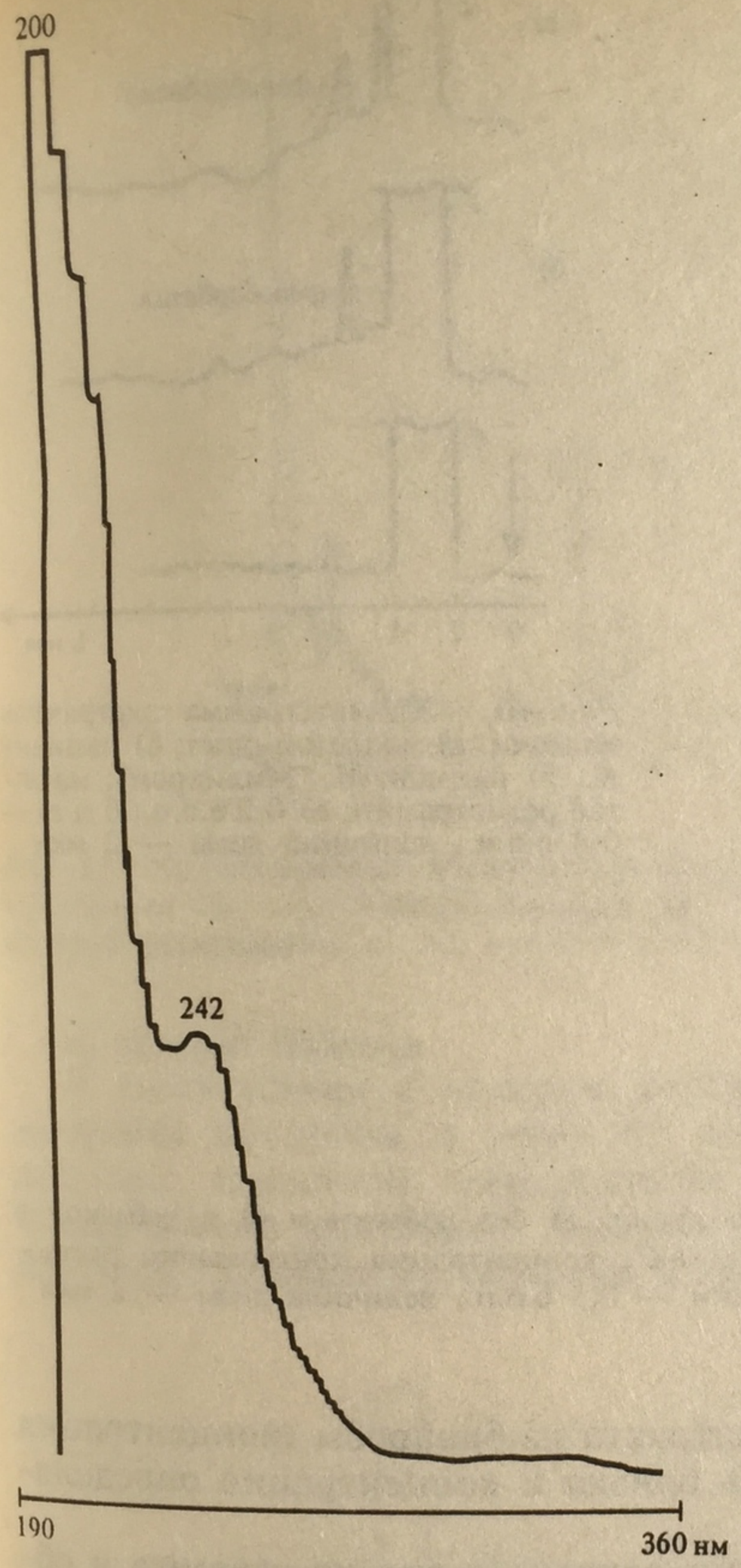
13.6. АНАЛИЗ БИОПРОБ НА СОДЕРЖАНИЕ БАРБИТУРАТОВ

Сухой экстракт, полученный после пробоподготовки биологического объекта (см. раздел "Пробоподготовка" главы 10), растворяют в 100 мл подвижной фазы и 4 мкл вводят в хроматографическую колонку.

13.6.1. Качественный анализ

Идентификация барбитуратов, содержащихся в биопробах, проводится следующим образом:

а) сопоставляются время (объем) удерживания и коэффициент емкости определяемого компонента и образца сравнения (контрольный раствор) индивидуальных барбитуратов;



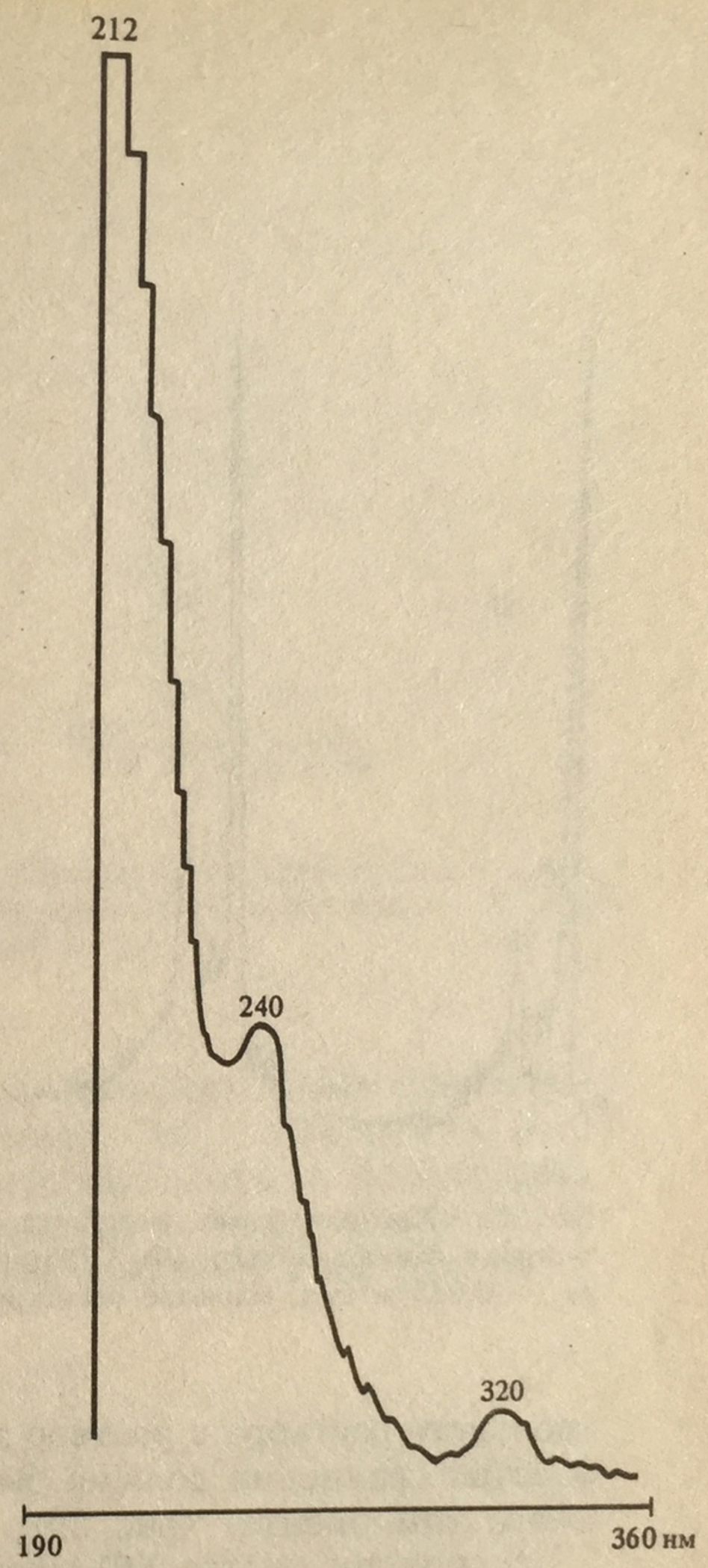


Рис. 37. УФ-спектр фенобарбитала в диапазоне длин волн 200 — 360 нм, скорость ленты — 12 мм/мин, время измерения — 1,0 с

Рис. 38. УФ-спектр этаминала натрия в диапазоне длин волн 200 — 360 нм, скорость ленты — 12 мм/мин, время измерения — 1,0 с

б) сравниваются УФ-спектры предполагаемого компонента и образца сравнения (на рис. 37 и 38 приведены УФ-спектры фенобарбитала и этаминала натрия в растворе подвижной фазы);

в) оценивается совпадение значений времени удерживания определяемого компонента и образца сравнения при добавлении кон-

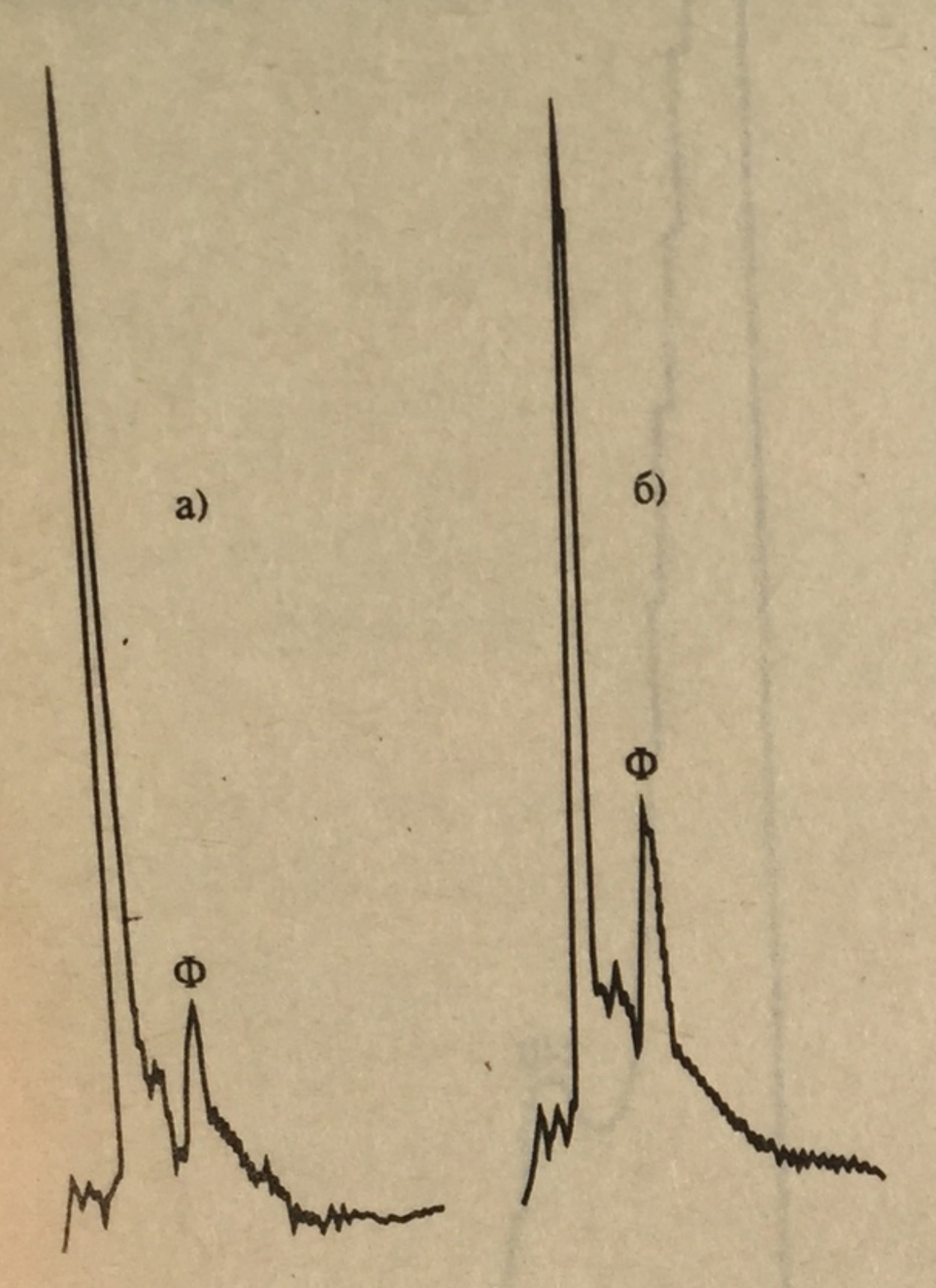


Рис. 39. Хроматограмма экстракта из крови: а) без добавки и б) с добавкой в экстракт фенобарбитала (Ф). "Милихром-2", концентрация контрольного раствора — 0,035 мг/мл, масштаб регистрации — 0,1 е.о.п., величина дозы — 2 мкл

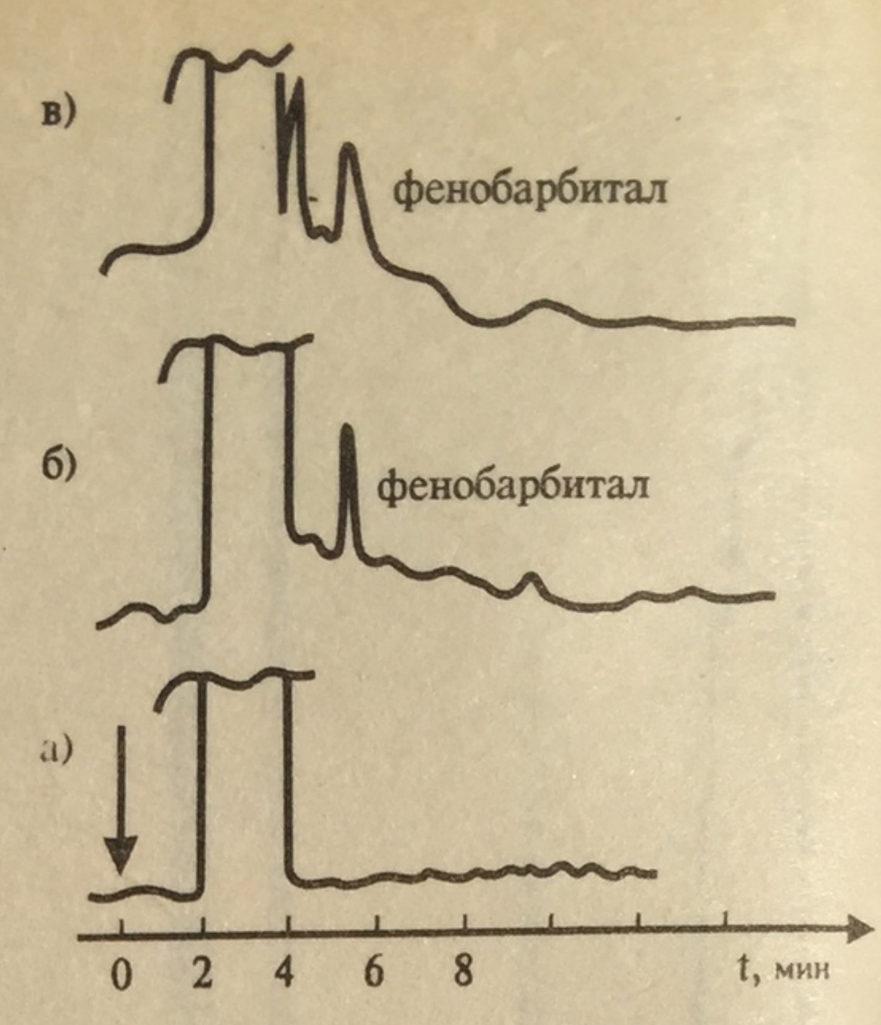


Рис. 40. Хроматограмма экстрактов из мочи: а) холостой опыт; б) пациент А.; в) пациент Б. "Милихром"; масштаб регистрации: а) 0,2 е.о.п.; б и в) — 0,4 е.о.п.; величина дозы — 2 мкл

трольного раствора в раствор экстракта из биопробы (концентрация образца сравнения должна быть близка к концентрации определяемого компонента) (рис. 39);

г) сопоставляются УФ-спектры определяемого компонента и образца сравнения при двух длинах волн, и оценивается их спектральное отношение.

На рис. 39 — 42 приведены примеры хроматограмм экстрактов из мочи, крови, печени, содержимого желудка, полученных на хроматографах "Милихром" и "Милихром-2". В экспертном материале обнаружены фенобарбитал и барбамил.

13.6.2. Количественный анализ

Для количественного анализа барбитуратов в биопробах можно использовать различные методы, в том числе метод добавки, метод внешнего стандарта, метод внутреннего стандарта и т.д.

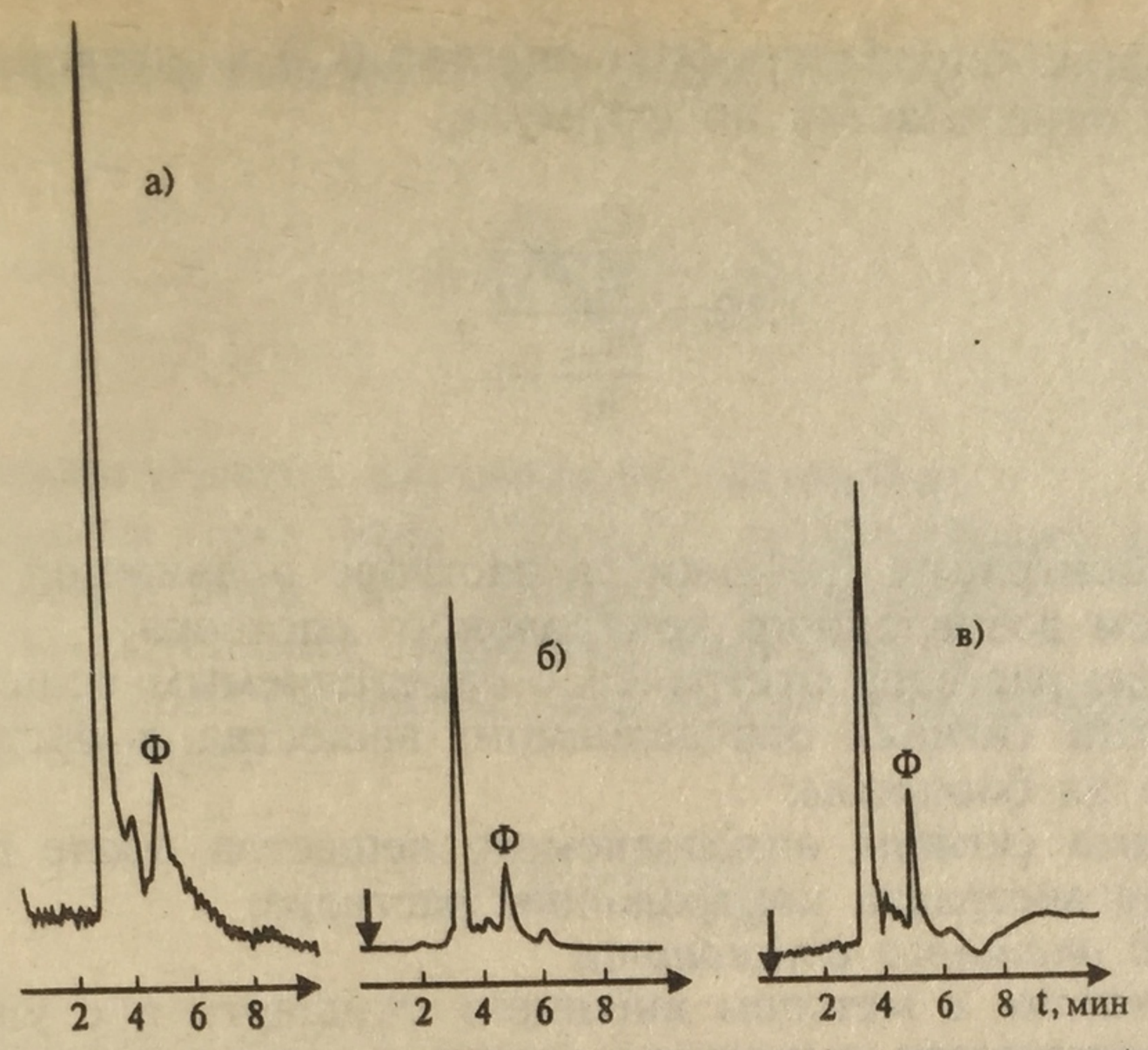


Рис. 41. Хроматограмма обнаружения фенобарбитала (Ф) в экстрактах из: крови (а); печени (б); содержимого желудка (в). "Милихром"; величина дозы — 2 мкл; масштаб регистрации: а) 0,1 е.о.п.; б и в) — 0,2 е.о.п.

а) *Метод добавки*

В соответствии с методом добавки проводят анализ раствора экстракта биопробы и этого же раствора, но с добавкой в него раствора, известной концентрации предполагаемого барбитурата (контрольного раствора). Анализы растворов "без добавки" и "с добавкой" должны проводиться в одном масштабе регистрации.

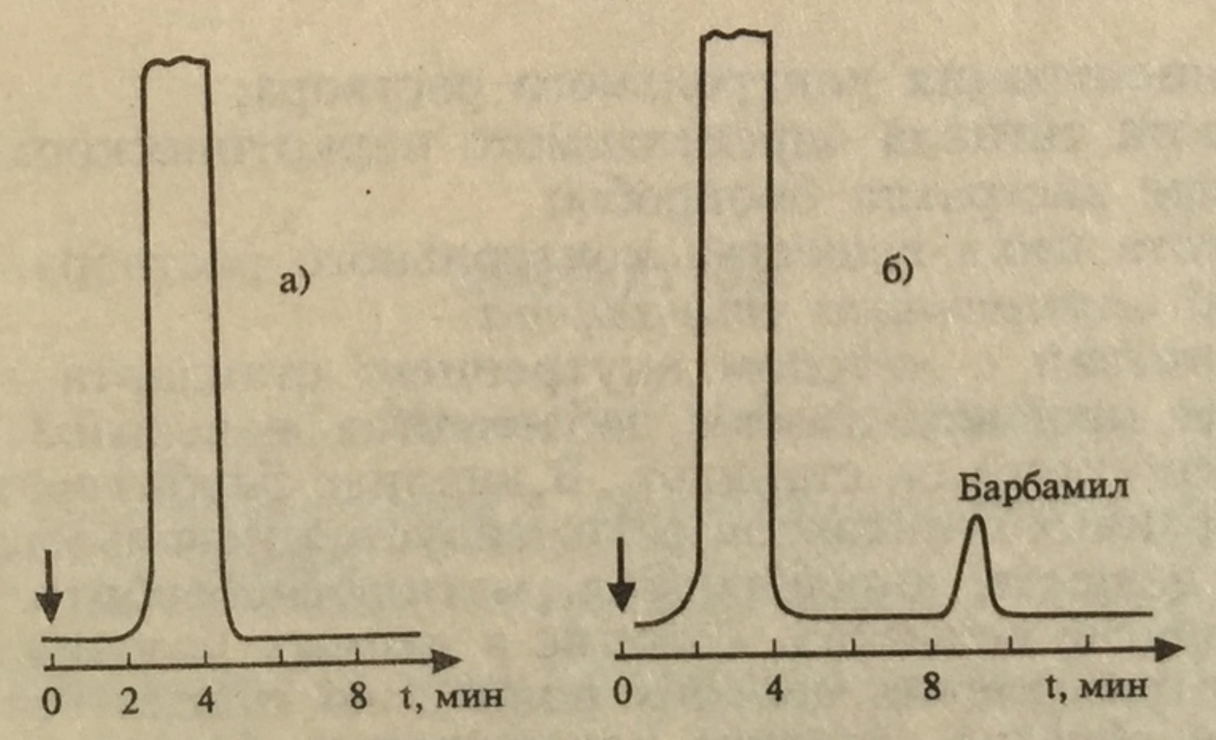


Рис. 42. Хроматограмма барбамила в экстракте из мочи: а) холостой опыт; б) пациент В. "Милихром-2"; масштаб регистрации — 0,2 е.о.п.; величина дозы — 8 мкл.

Условия анализа: хроматографическая колонка — C_{18}; ПФ — $(NH_4)_2HPO_4$(0,05М) — ацетонитрил (45 : 55); λ — 200 нм

Концентрация определяемого вещества (C_i) в растворе экстракта из биопробы определяется по формуле

$$C_i = \frac{\frac{C_k \cdot V_k}{V_i + V_k}}{\frac{h_{i+k}}{h_i} - 1},$$

где

C_k — концентрация "добавки" в растворе подвижной фазы;

V_k — объем добавленного контрольного раствора;

V_i — объем раствора экстракта с определяемым веществом;

h_i — высота сигнала определяемого вещества в растворе экстракта из биопробы;

h_{i+k} — высота сигнала определяемого вещества после добавки в раствор экстракта контрольного раствора.

б) *Метод внешнего стандарта*

В соответствии с методом внешнего стандарта и с учетом линейности зависимости выходного сигнала от массы вещества последовательно, с анализом раствора экстракта биопробы, проводят анализ контрольного раствора идентифицированного вещества. Концентрация контрольного раствора (C_k) должна быть близка к концентрации определяемого вещества в растворе экстракта. Анализы контрольного раствора и экстракта биопробы должны проводиться в одном масштабе регистрации.

Концентрация определяемого вещества в растворе экстракта (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_k \cdot h_i}{h_k},$$

где

C_k — концентрация контрольного раствора;

h_i — высота сигнала определяемого наркотического вещества в растворе экстракта биопробы;

h_k — высота пика вещества контрольного раствора.

в) *Метод внутреннего стандарта*

В соответствии с методом внутреннего стандарта в биообъект до операции пробоподготовки добавляется известное количество вещества, принятого за стандарт. В анализе барбитуратов в количестве внутренних стандартов рекомендуется использовать одно из следующих веществ: апробарбитал, метилфенобарбитал, фенилгидантоин и другие вещества, которые в данных условиях хроматографического разделения должны полностью отделяться от других компонентов образца, должны элюироваться близко к пику анализируемого соединения, не реагировать с другими компонентами, т.е. удовлетворять требованиям, предъявляемым к внутреннему стандарту. Можно использовать одновременно два и более внутренних стандарта.

Концентрация определяемого вещества (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_{вс} \cdot h_i}{h_{вс}} \cdot \frac{1}{F_{i/вс}},$$

где

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта;
h_i — высота пика (или площадь) определяемого вещества;
$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) стандарта;
$F_{i/вс}$ — относительный калибровочный фактор.

Относительный калибровочный фактор компонента $F_{i/вс}$ вычисляется по формуле

$$F_{i/вс} = \frac{h_i \cdot C_{вс}}{C_i \cdot h_{вс}},$$

где

h_i — высота пика (или площадь) компонента известной концентрации (калибровочный раствор);
c_i — концентрация калибровочного раствора определяемого компонента;
$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) внутреннего стандарта;
$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта.

Содержание фенобарбитала и барбамила в экстрактах из крови и мочи (рис. 39, 41 и 40, 42) определялось по методу добавки и по методу внешнего стандарта. Результаты хорошо сопоставимы. Концентрация фенобарбитала в экстракте из крови, рассчитанная по методу добавки (рис. 39), составила 0,037 мг/мл, а по методу внешнего стандарта — 0,041 мг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mangin P., Lignier A.A., Chaumout A.Y.*//Journal of Analytical Toxicology. 1987. N 11. P. 27.
2. *Sotto-Otera R., Mendez-Alverez E., Sierra-Morano G.*//Journal of Liquid Chromatography. 1988. N 11. P. 3021.
3. *Bhargava V.O., Sion W.H., Carretson L.K.*//Journal of Chromatography. 1985. Vol. 343. P. 219.
4. *Tjoden U.R., Kraak J.C., Huber J.F.K.*//Journal of Chromatography. 1977. Vol. 143. P. 183.
5. *Gill R., Lopes A.A.T., Moffart A.C.*//Journal of Chromatography. 1981. Vol. 226. P. 117.
6. *Lopes-Rivadulla M., Fernandez P.*//Analytical Letters. 1988. N 21. P. 2253.
7. *Окуджава В.М., Чапквеладзе и др.*//Фармация. 1989. Т. 38. № 5. С. 44.
8. *Delong J., Nielen M.W.F. et al.*//Journal of Chromatography. 1986. Vol. 381. P. 431.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Энгельгард Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях/Под ред. К.В. Чмутова. М.: "Мир", 1980.

2. *Шатц В.Д., Сахартова О.В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: "Зинатне", 1988.

3. *Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: "Химия", 1986.

4. ВЭЖХ в биохимии/Под ред. А. Хеншен и др. М.: "Мир", 1988.

5. *Схунмаркерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии/Под ред. В.А. Даванкова. М.: "Мир", 1989.

ГЛАВА 14

ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ

14.1. ПРОБОПОДГОТОВКА

В соответствии с методикой изолирования эфедрина и эфедрона из образца мочи [5] к 10 мл мочи добавляется 5% раствора гидроксида натрия до pH=11, 10 мл бензола и 5 мкл раствора амфетамина (используемого в качестве внутреннего стандарта) с концентрацией 10 мг/мл. После встряхивания в течение 3 минут и центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 минут бензольный слой упаривается досуха в токе холодного воздуха. Сухой остаток растворяется в 0,5 мл подвижной фазы, и 2 — 10 мкл вводится в хроматографическую колонку. На рис. 44 и 45 приведены хроматограммы экстрактов из пробы холостой мочи, не содержащей анализируемых веществ, и из мочи, содержащей эфедрин, эфедрон и амфетамин (внутренний стандарт) с концентрациями соответственно 50, 50 и 4 мкг/мл.

14.2. ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ НА МИКРОКОЛОНОЧНЫХ ЖИДКОСТНЫХ ХРОМАТОГРАФАХ СЕРИИ "МИЛИХРОМ"

Для разделения фенилалкиламинов методом ВЭЖХ рекомендуются следующие условия:

— хроматографическая колонка (62 x 2 мм), заполненная обращенно-фазным сорбентом "Сепарон" C_{18} (5 мкм) (колонка поставляется с хроматографом);

— в качестве подвижной фазы (элюента) для разделения фенилалкиламинов используется смесь водного раствора ортофосфорной кислоты (0,2 М), метанола и диэтиламина (75:20:1). Добавление диэтиламина улучшает форму пиков и позволяет сократить время анализа;

— детектирование фенилалкиламинов проводится при 210 нм;

— скорость элюирования — 50 мкл/мин.

14.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭЛЮЕНТА И ЭТАЛОННЫХ РАСТВОРОВ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

а) В мерной посуде готовится раствор ортофосфорной кислоты в дистиллированной воде (0,2 М). Для этого:

— на аналитических весах берется навеска 1,67 г ортофосфорной кислоты;

— навеска переносится в колбу на 100 мл, объем доводится дистиллированной водой до метки, и смесь встряхивается до полного растворения (раствор № 1).

б) В мерный цилиндр на 100 мл переносится 75 мл раствора № 1, 20 мл метанола и 1 мл свежеперегнанного при 56°С диэтиламина. Смесь хорошо перемешивается.

в) Для приготовления эталонных растворов анализируемых фенилалкиламинов используются чистые субстанции норэфедрина, эфедрона, эфедрина, амфетамина и метамфетамина, и проводят следующие операции:

— на лабораторных весах взвешивается по 25 ± 1 мг указанных веществ;

— навеска каждого вещества переносится в соответствующую маркированную отдельную колбу на 50 $см^3$ и заполняется элюентом до метки;

— содержимое колбы встряхивается до полного растворения осадка.

Эталонные растворы сравнения анализируемых фенилалкиламинов могут сохраняться при +4°С в течение 3 месяцев. Эти растворы служат для идентификации указанных веществ, определения их хроматографических параметров, а также для приготовления контрольных растворов при проведении количественных анализов.

Элюент и эталонные растворы сравнения перед использованием необходимо очистить от механических примесей (пыль из атмосферы, частицы вещества), которые могут забивать фильтры колонки и нарушать нормальную работу насоса и хроматографической колонки. Для удаления этих примесей используется владипоровская мембрана МФА-МА № 2 (ТУ 8-05-1903-84) с размером пор 0,15 — 0,25 мкм или мелкопористый стеклянный фильтр. Элюент перед работой необходимо продегазировать в течение 10 минут. Для этого используется ток газообразного гелия (ТУ 51-940-80) при расходе 40 — 50 мл/мин, обработка на ультразвуковой бане или вакуумный насос.

14.4. АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПАРАМЕТРОВ УДЕРЖИВАНИЯ

Тестовая модельная смесь норэфедрина, эфедрона, эфедрина, амфетамина, метамфетамина готовится в растворе подвижной фазы. Для этого:

а) берется навеска норэфедрина (1 ± 0,2 мг), эфедрина (1,6 ± 0,2 мг), эфедрона (2,35 ± 0,2 мг), амфетамина (1 ± 0,2 мг), метамфетамина (3,3 ± 0,2 мг);

б) навески переносятся в колбу 50 $см^3$, объем доводится до метки, смесь встряхивается до полного растворения и фильтруется. Смесь должна сохраняться при + 4°С.

Хроматографирование модельной смеси проводится при следующих условиях:

расход элюента — 100 мкг/мл;
объем вводимой пробы — 7 мкл;
масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.;
время измерения — 0,3 с;
длина волны — 210 нм.

Хроматограмма анализа модельной смеси в искусственной моче приведена на рис. 43, а основные хроматографические параметры — коэффициент емкости (K′), степень разделения (R_s), селективность (α) — в табл. 46.

Таблица 46. **Хроматографические параметры разделения фенилалкиламинов**

Вещество	Коэффициент емкости, K′ $K' = \frac{V_R - V_o}{V_o}$	Селективность $\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$				Степень разделения, $R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_{0,5(1)} + \omega_{0,5(2)}}$			
		2/1	3/2	4/3	5/4	2/1	3/2	4/3	5/4
Норэфедрин	0,92	-	-	-	-	-	-	-	-
Эфедрин	1,39	1,51	-	-	-	1,66	-	-	-
Эфедрон	1,90	-	1,36	-	-	-	1,0	-	-
Амфетамин	2,19	-	-	1,15	-	-	-	0,58	-
Метамфетамин	2,97	-	-	-	1,35	-	-	-	1,17

Примечание. V_R — объем удерживания (мкл); V_o — объем удерживания несорбируемого компонента (нитрата натрия) составляет 154 мкл; Δt — разность времени удерживания разделяемых соседних веществ (мм); $\omega_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты (мм).

Выбранная методика позволяет проводить анализ и других представителей этой группы: фенилэтиламина, тирамина, псевдоэфедрина, диэтилпропиона, фенилфлурамина, фентермина, фенилпропаноламина и норпсевдоэфедрина. В табл. 47 приведены значения объемов удерживания и коэффициентов емкости всех анализируемых производных фенилалкиламина.

Рис. 43. Хроматограмма смеси в искусственной моче (1) норэфедрина (2), эфедрина (3), эфедрона (4), амфетамина (5), метамфетамина (6). "Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 7 мкл; λ — 210 нм

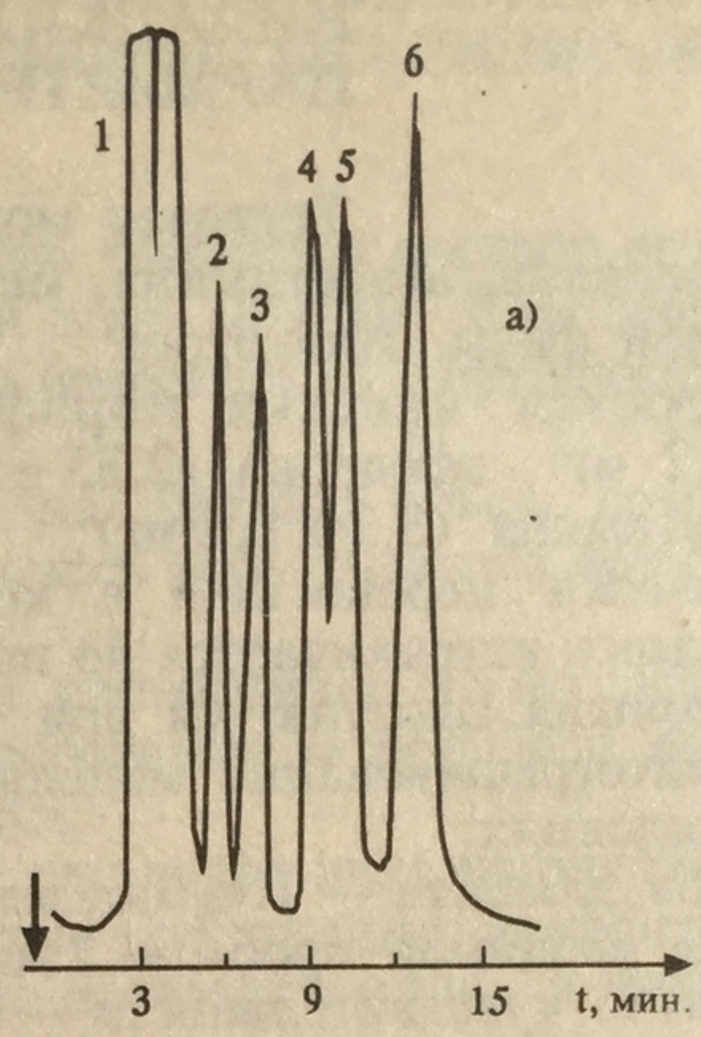


Таблица 47. **Объемы удерживания и коэффициенты емкости фенилалкиламинов**

Вещество	V_R	k'
Тирамин	195	0,26
Фенилпропаноламин	302	0,88
Норэфедрин	310	0,92
Норпсевдоэфедрин	333	1,10
Фенилэтиламин	342	1,15
Эфедрин	383	1,39
Псевдоэфедрин	390	1,52
Эфедрон	455	1,90
Амфетамин	494	2,19
Метамфетамин	639	2,97
Фентермин	883	3,81
Диэтилпропион	1195	6,47
Фенилфлурамин	1616	9,20

14.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Предел обнаружения анализируемого вещества устанавливается по величине такого количества вещества, которое вызывает сигнал, превышающий в 5 раз уровень флюктуационных шумов, который на шкале чувствительности 0,1 е.о.п. (для хроматографов "Милихром-2" и "Милихром-4") и 0,4 е.о.п. (для хроматографа "Милихром") составляет 2 мм. Отсюда минимальное значение сигнала h_{min}= 2 мм × 5.

Значение пределов обнаружения (G_{min}, мг) рассчитывается по формуле

$$G_{min} = \frac{h_{min} \cdot C \cdot q \cdot M}{h_i \cdot M_i},$$

где

C — концентрация анализируемого вещества;

q — объем вводимой пробы, мл;

h_i — высота пика анализируемого вещества на шкале чувствительности M_i;

M — масштаб чувствительности при определении уровня флюктуационных шумов.

В табл. 48 приведены значения коэффициентов чувствительности и пределов обнаружения по всем определяемым фенилалкиламинам во вводимой дозе, полученные на хроматографе "Милихром-2" по предложенной методике.

Таблица 48. **Пределы обнаружения фенилалкиламинов**

Вещество	Коэффициент чувствительности, K (мг/мл × 10^6)	Предел обнаружения, нг
Эфедрин	1,7	6,0
Эфедрон	1,0	10,0
Норэфедрин	3,0	3,3
Амфетамин	6,1	1,6
Метамфетамин	1,25	8,0

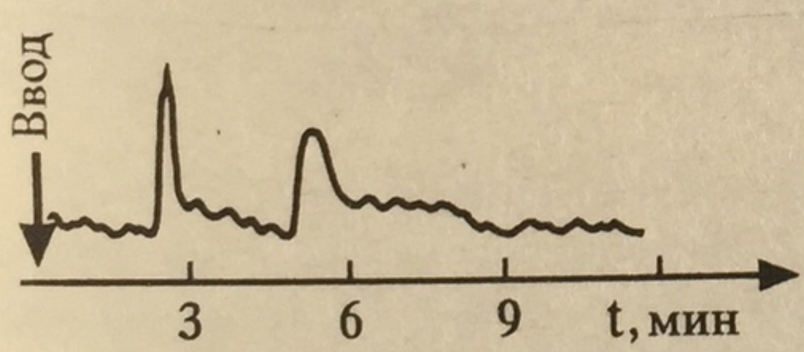


Рис. 44. Хроматограмма пробы холостой мочи. "Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; λ — 210 нм, вводимая доза — 5 мкл

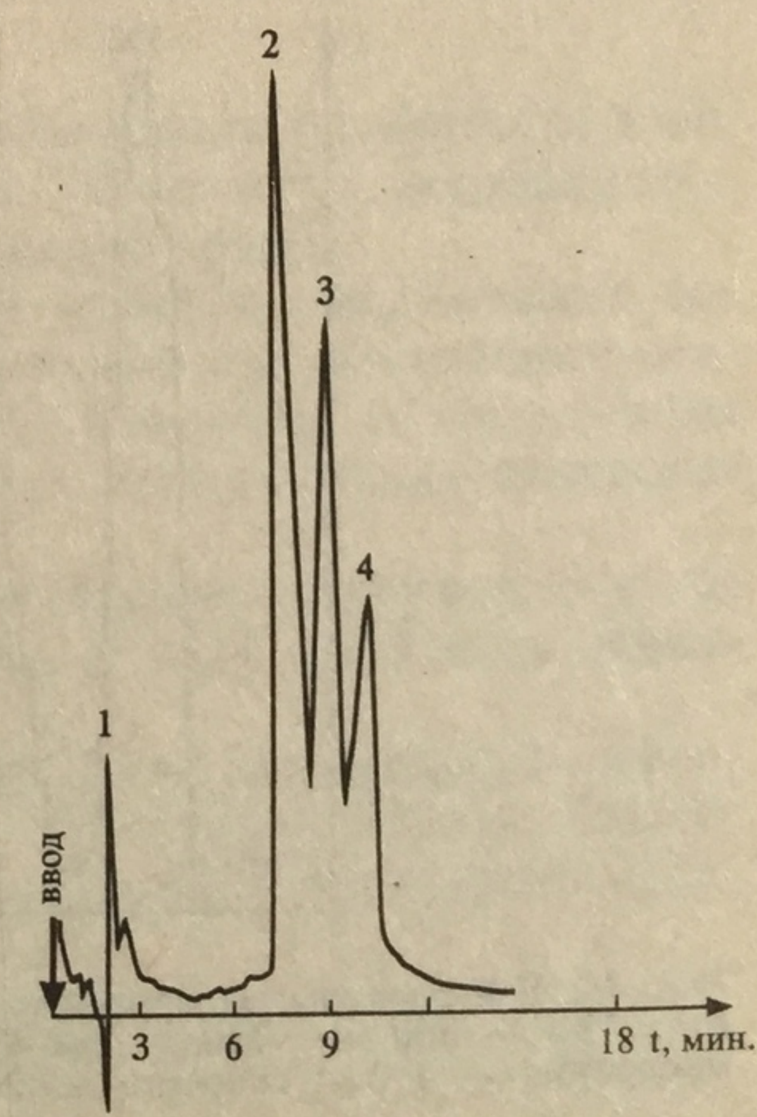


Рис. 45. Хроматограмма экстракта из мочи (1), содержащей эфедрин (2), эфедрон (3), амфетамин (4) (внутренний стандарт). "Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 2 мкл; λ — 210 нм

14.6. АНАЛИЗ БИОПРОБ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ

14.6.1. Качественный анализ

Идентификация фенилалкиламинов, содержащихся в биопробах, производится следующим образом:

а) сопоставляются время (объемы) удерживания и коэффициенты емкости определяемого компонента и образца сравнения (эталонный раствор) индивидуальных фенилалкиламинов;

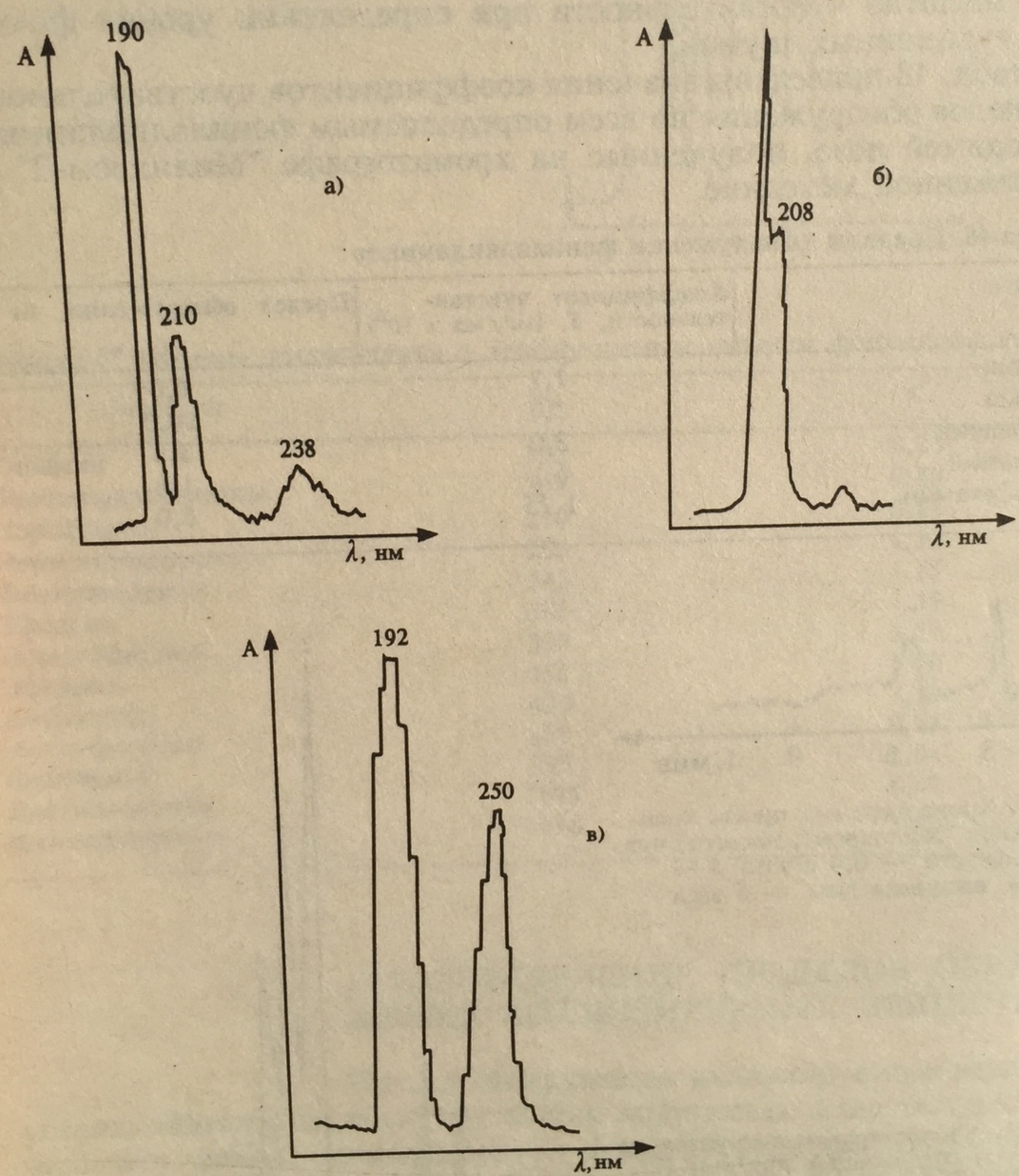


Рис. 46. УФ-спектры: а) норэфедрина б) эфедрина и в) эфедрона в диапазоне длин волн 190 — 360 нм. "Милихром-4"; масштаб чувствительности — 0,8 е.о.п.; время измерения — 1,0 с; скорость ленты — 30 мм/мин

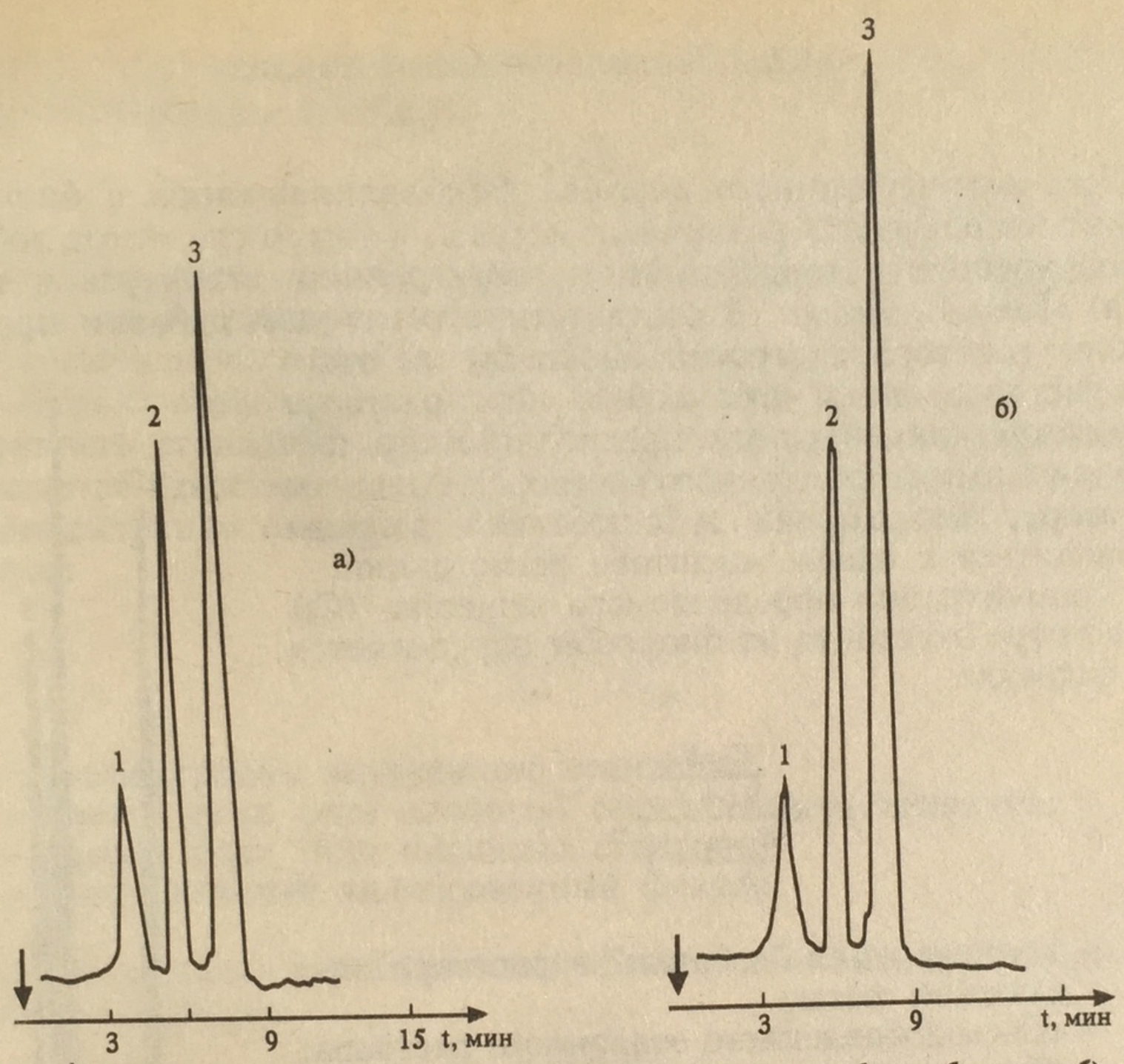


Рис. 47. Хроматограмма экстракта из мочи пациента П.: а) без добавки и б) с добавкой в экстракт эфедрина. "Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 5 мкл; λ — 210 нм. 1 — фон мочи; 2 —неидентифицированный пик; 3 — эфедрин

б) сравниваются УФ-спектры предполагаемого компонента и образца сравнения (на рис. 46 приведены УФ-спектры норэфедрина, эфедрона и эфедрина в растворе подвижной фазы);

в) оценивается совпадение значений времени удерживания определяемого компонента и образца сравнения при добавлении эталонного раствора в раствор экстракта из биопробы (концентрация образца сравнения должна быть близка к концентрации определяемого компонента) (рис. 47);

г) сопоставляются УФ-спектры определяемого компонента и образца сравнения при двух длинах волн, и оценивается их спектральное отношение.

На рис. 48 приведена хроматограмма смеси норэфедрина, эфедрина и эфедрона при значениях длин волн 210 и 250 нм. Спектральные отношения (A_{250}/A_{210}) для норэфедрина, эфедрина и эфедрона — соответственно 0,32; 0,34; 0,74.

14.6.2. Количественный анализ

Для количественного анализа фенилалкиламинов в биопробах можно использовать различные методы, в том числе метод добавки, метод внешнего стандарта, метод внутреннего стандарта и т.д.

а) *Метод добавки.* В соответствии с методом добавки проводят анализ раствора экстракта биопробы из этого же раствора, но с добавкой в него раствора известной концентрации предполагаемого фенилалкиламина (эталонного раствора). Анализы растворов "без добавки" и "с добавкой" должны проводиться в одном масштабе регистрации.

Концентрация определяемого вещества (C_i) в растворе экстракта из биопробы определяется по формуле

$$C_i = \frac{\dfrac{C_k \cdot V_k}{V_i + V_k}}{\dfrac{h_{i+k}}{h_i} - 1},$$

где

C_k — концентрация "добавки" в растворе подвижной фазы;

V_k — объем добавленного эталонного раствора;

V_i — объем раствора экстракта с определяемым веществом;

h_i — высота сигнала определяемого вещества в растворе экстракта из биопробы;

h_{i+k} — высота сигнала определяемого вещества после добавки в раствор экстракта эталонного раствора.

б) *Метод внешнего стандарта.* В соответствии с методом внешнего стандарта и с учетом линейной зависимости выходного сигнала от массы вещества последовательно, сразу же после анализа раствора экстракта биопробы проводят анализ эталонного раствора идентифицированного вещества. Концентрация эталонного раствора (C_k) должна быть близка к концентрации определяемого вещества в растворе экстракта. Анализы эталонного раствора и экстракта биопробы должны проводиться в одном масштабе регистрации.

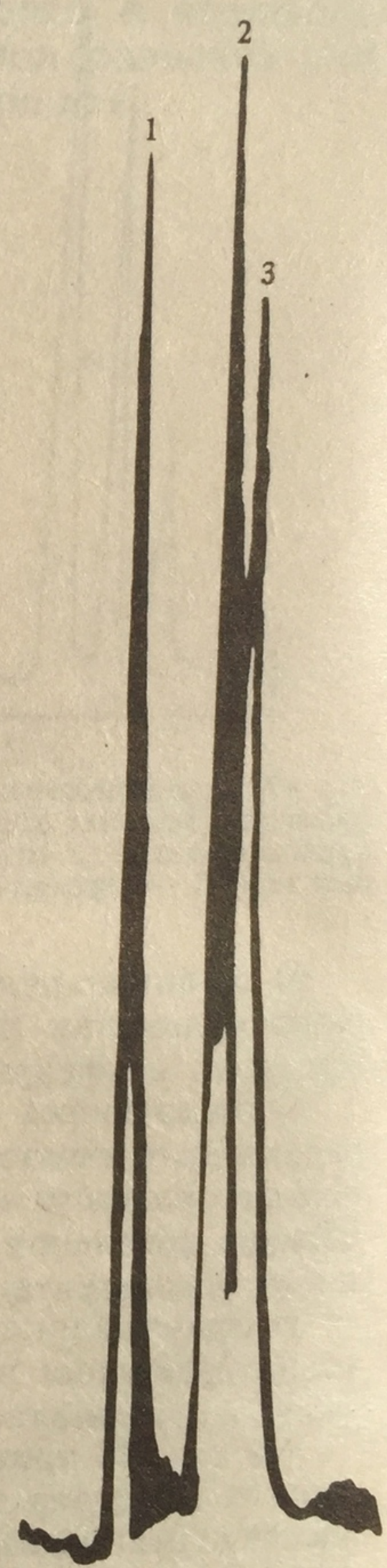


Рис. 48. Хроматограмма смеси норэфедрина (1), эфедрина (2) и эфедрона (3) при двух длинах волн — 210 нм (заштриховано) и 250 нм. "Милихром-4"; масштаб чувствительности — 0,2 е.о.п.

Концентрация определяемого вещества в растворе экстракта (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_k \cdot h_i}{h_k},$$

где

h_i — высота сигнала определяемого наркотического вещества в растворе экстракта биопробы;

h_k — высота пика вещества эталонного раствора.

в) *Метод внутреннего стандарта.* В соответствии с методом внутреннего стандарта к биообъекту до операции пробоподготовки добавляется известное количество вещества, принятого за стандарт.

Концентрация определяемого вещества (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_{вс} \cdot h_i}{h_{вс}} \cdot \frac{1}{F_{i/вс}},$$

где

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта;

h_i — высота пика (или площадь) определяемого вещества;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) стандарта;

$F_{i/вс}$ — относительный калибровочный фактор.

Относительный калибровочный фактор компонента $F_{i/c}$ вычисляется по формуле

$$F_{i/c} = \frac{h_i \cdot C_{вс}}{C_i \cdot h_{вс}},$$

где

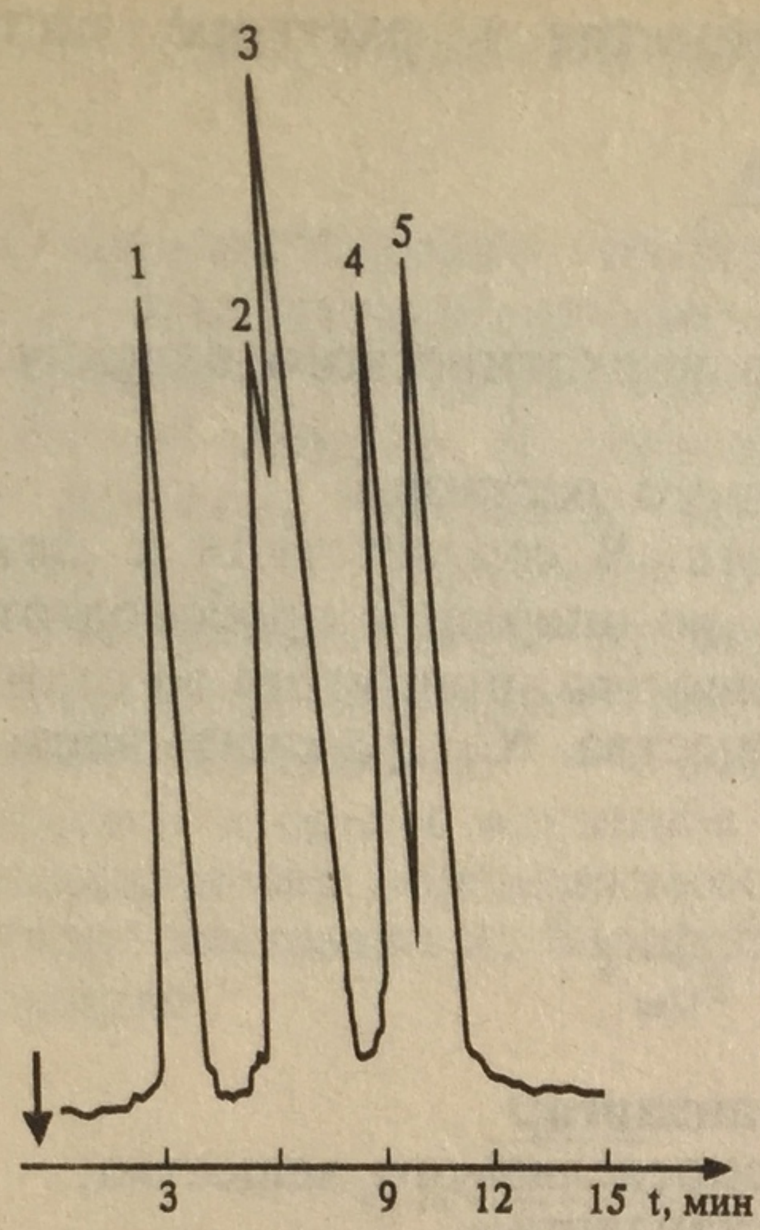
h_i — высота пика (или площадь) компонента известной концентрации (калибровочный раствор);

C_i — концентрация калибровочного раствора определяемого компонента;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) внутреннего стандарта;

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта.

Методом внутреннего стандарта было определено количественное содержание эфедрона и эфедрина в моче добровольца после приема перорально 100 мг эфедрона. В качестве внутреннего стандарта использовался амфетамин с концентрацией 20 мкг/мл. На рис. 49 и 50 приведены хроматограммы экстрактов из мочи через 2 и 36 часов после приема. Концентрация эфедрина и эфедрона в моче через 2 часа после приема составляет соответственно 25 и 12,8 мкг/мл. Концентрация эфедрина в моче через 36 часов после приема — 1,5 мкг/мл.



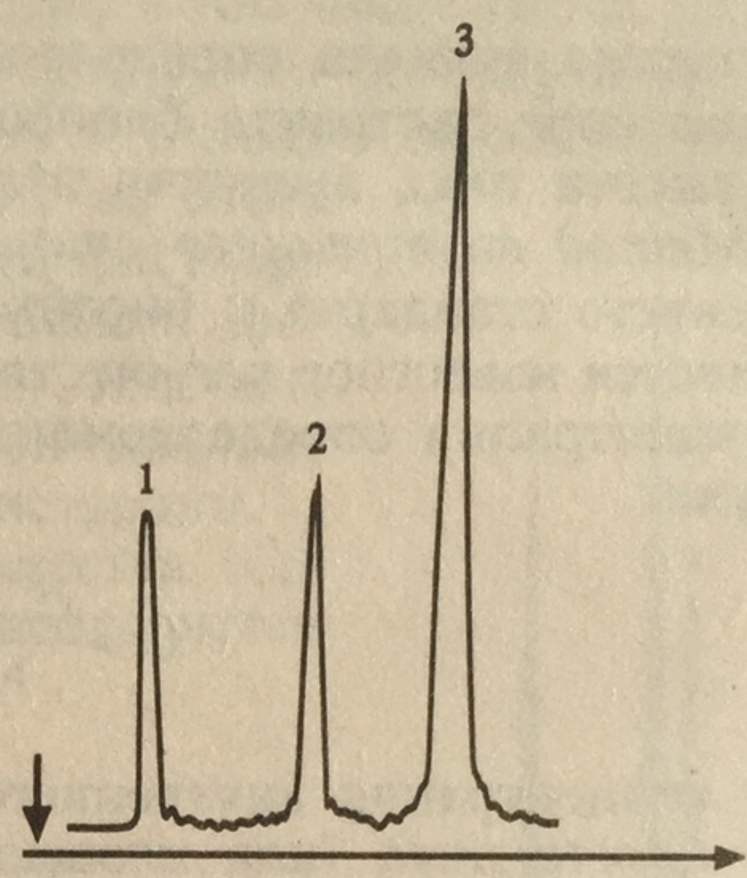


Рис. 49. Хроматограмма экстракта из мочи добровольца через 2 часа после приема 100 мг эфедрона:
1 — фон мочи, 2 — эфедрин, 3 — псевдоэфедрин, 4 — эфедрон, 5 — амфетамин (внутренний стандарт с концентрацией — 20 мкг/мл).
"Милихром"; λ — 210 нм; вводимая доза — 2 мкл; масштаб чувствительности: эфедрин, псевдоэфедрин, эфедрон — 0,8 е.о.п.; амфетамин — 1,6 е.о.п.

Рис. 50. Хроматограмма экстракта из мочи добровольца через 36 часов после приема 100 мг эфедрона:
1 — фон мочи; 2 — эфедрин (0,2 е.о.п.); 3 — амфетамин (1,6 е.о.п.).
"Милихром-4"; λ — 210 нм; вводимая доза — 2 мкл

14.7. СЕЛЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЭФЕДРОНА

Используя значительное различие в коэффициентах молярного поглощения эфедрона и других соединений этой группы при 250 нм (см. табл. 46 и рис. 46), можно провести селективный анализ эфедрона в смеси с другими компонентами этой группы — норэфедрином, эфедрином, амфетамином, метамфетамином. При этом анализ проводится путем детектирования при двух длинах волн: 210 нм для регистрации всех определяемых фенилалкиламинов и 250 нм для селективно определяемого эфедрона с последующим сопоставлением полученных хроматограмм для количественного определения эфедрона в биопробах.

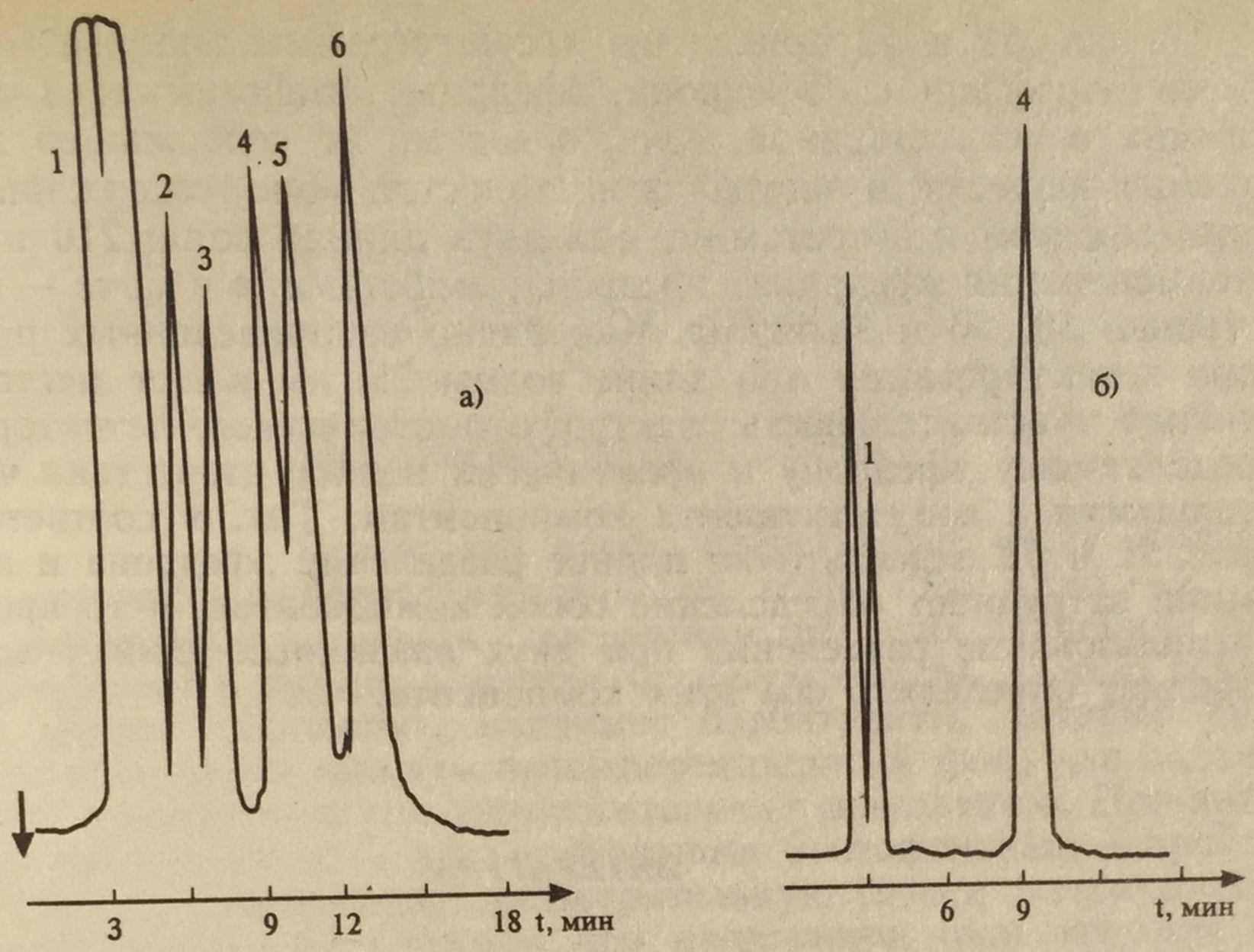


Рис. 51. Хроматограмма модельной смеси норэфедрина (2), эфедрина (3), эфедрона (4), амфетамина (5) и метамфетамина (6) в искусственной моче (1) при значении длины волны: а) 210 нм; б) 250 нм.
"Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 7,0 мкл

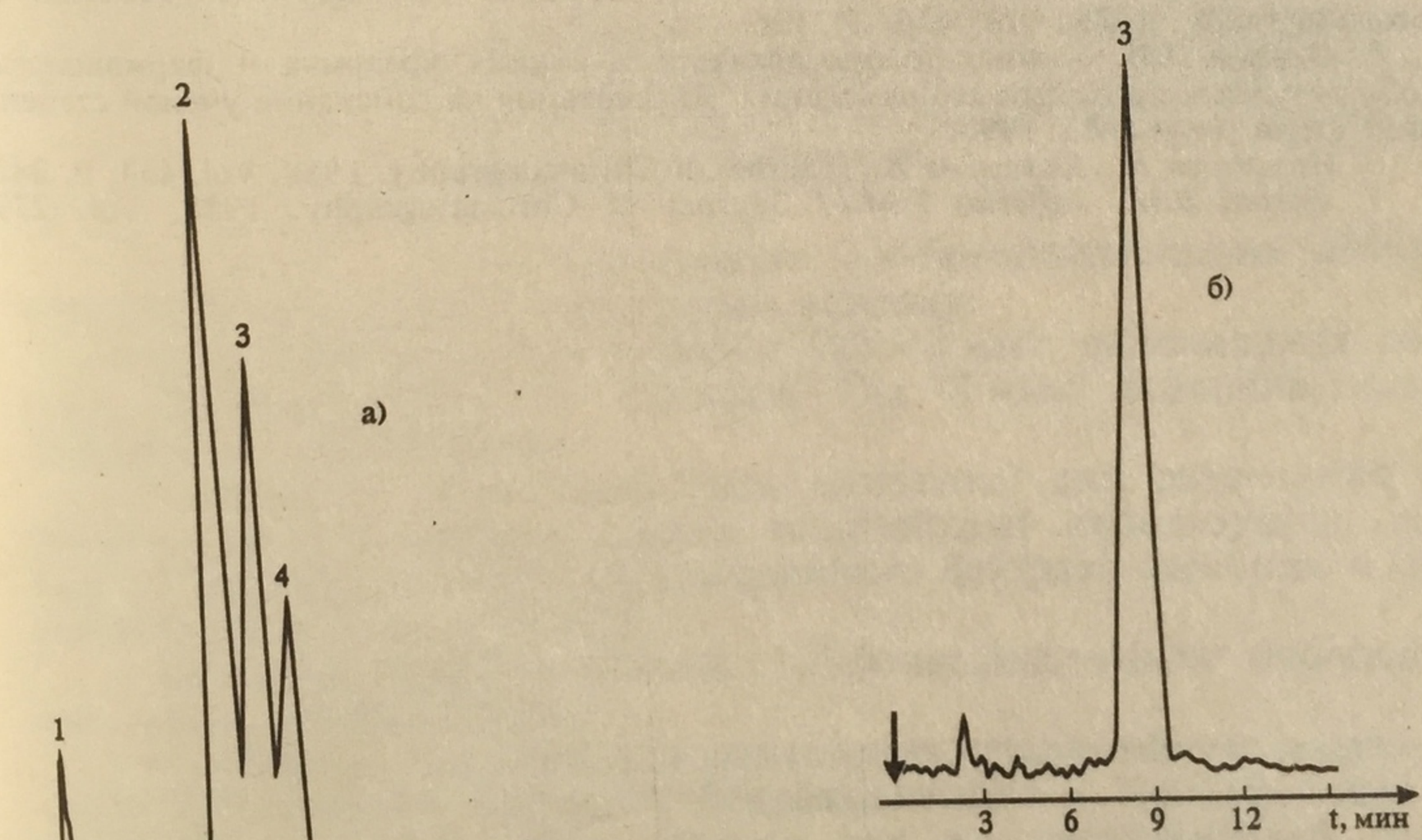


Рис. 52. Хроматограмма смеси эфедрина (2), эфедрона (3), амфетамина (4) в холостой моче: а) 210 нм; б) 250 нм.
"Милихром"; масштаб чувствительности — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 2 мкл

На рис. 51 и 52 приведены хроматограммы анализа модельной смеси норэфедрина, эфедрона, эфедрина, амфетамина и метамфетамина в искусственной моче, заведомо не содержащей анализируемых веществ, и экстракта на холостой моче, содержащей эфедрин, эфедрон и амфетамин, при двух длинах волн: 210 и 250 нм. Концентрация эфедрина, эфедрона, амфетамина в моче — соответственно 50, 50 и 5 мкг/мл. Как видно из приведенных рисунков, при детектировании при длине волны 250 нм имеет место селективная чувствительность спектрофотометрического детектора к определяемому эфедрону и практически полное отсутствие чувствительности к сопутствующим компонентам. Так, в соответствии с рис. 51 и 52 недостаточно полное разделение эфедрона и амфетамина затрудняет определение обоих компонентов, в то время как использование разделения при двух различных длинах волн позволяет определить оба этих компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Clark E.G.C.* Isolation and Identification of Drugs. London, 1975. Vol. 1, 2.
2. *Yonecura T., Kamata S., Wasa M., Okada A.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol. 472. P. 320.
3. *Neider H., Jaeger H.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol. 427. P. 74.
4. *Brendel E., Meineks I., Henne E.M., Zschunte M., Mey C.D.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol. 426. P. 406.
5. *Фадеев В.И.* Химико-токсикологический анализ эфедрина и фармакологически активных продуктов его окисления: Диссертация на соискание ученой степени канд. фарм. наук. М., 1990.
6. *Hayakawa K., Hasegawa K.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol. 464. P. 343.
7. *Farrell B.H., Jefferies T.M.*// Journal of Chromatography. 1988. Vol. 272. P. 111.

ГЛАВА 15

ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА

15.1. ПРОБОПОДГОТОВКА

Подготовка пробы представляет собой жидкостную экстракцию бензодиазепинов из мочи при pH=5 — 8. В случае анализа по нативным соединениям при этих значениях pH экстрагируются и другие вещества (слабые кислоты, слабые основания, другие амфолиты), например барбитураты, которые при исследовании будут вносить интерференционный фон, что может привести к получению ложноположительных результатов. При анализе по производным — соответствующим бензофенонам — пробоподготовка включает в себя предварительную (перед экстракцией) обработку биообъекта кислотой при нагревании, цель которой — перевести нативные соединения и их метаболиты в аминобензофеноны.

15.2. ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВ НА МИКРОКОЛОНОЧНОМ ЖИДКОСТНОМ ХРОМАТОГРАФЕ СЕРИИ "МИЛИХРОМ"

Для разделения 1,4-бензодиазепинов методом ВЭЖХ рекомендуются следующие условия:

— хроматографическая колонка (62 × 2 мм), заполненная обращенно-фазным сорбентом "Сепарон" C_{18} (5 мкм) (колонка поставляется с хроматографом);

— в качестве подвижной фазы (элюента) для разделения нативных бензодиазепинов (кроме медазепама) используется смесь 0,05 М водного раствора двузамещенного фосфата аммония и ацетонитрила (65:35) — pH=7,8;

— детектирование нативных 1,4-бензодиазепинов проводится при длине волны 230 нм;

— в качестве элюента для разделения продуктов гидролитического расщепления нативных бензодиазепинов — бензофенонов (и медазепама) используется система тех же растворителей, но в соотношении 45:55;

— детектирование бензофенонов проводится при длине волны 220 нм;

— скорость потока элюирования — 100 мкл/мин.

15.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭЛЮЕНТА И ЭТАЛОННЫХ РАСТВОРОВ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

а) В мерной посуде готовится раствор дигидрофосфата аммония в дистиллированной воде — 0,5 М (раствор № 1). Для этого:

— на аналитических весах берется навеска 0,66 г дигидрофосфата аммония $(NH_4)_2HPO_4$;

— навеска переносится в колбу на 100 мл, объем доводится дистиллированной водой до метки, и смесь встряхивается до полного растворения осадка.

б) Для приготовления 0,05 М раствора дигидрофосфата аммония 10 мл раствора № 1 переносится в мерную колбу на 100 мл и объем доводится до метки дистиллированной водой (раствор № 2). Смесь встряхивается до полного перемешивания.

в) Для приготовления эталонных растворов сравнения анализируемых бензодиазепинов и бензофенонов используются чистые субстанции гидазепама, оксазепама, нитразепама, хлордиазепоксида, феназепама, диазепама, медазепама, АНБ, АХБ, АБХБ и МХБ. Для этого:

— на лабораторных весах взвешивается по 25 ± 1 мг указанных веществ;

— навеска каждого вещества переносится в соответствующую отдельную колбу на 50 $см^3$ и заполняется элюентом до метки; содержимое колбы встряхивается до полного растворения осадка.

Эталонные растворы сравнения анализируемых бензодиазепинов и бензофенонов могут сохраняться при +4°С в течение 3 месяцев. Эти растворы служат для идентификации указанных веществ, определения их хроматографических параметров, а также для приготовления контрольных растворов при проведении количественных анализов.

Элюент и эталонные растворы сравнения перед использованием необходимо очистить от механических примесей (пыль из атмосферы, частицы вещества), которые могут забивать фильтры колонки и нарушать нормальную работу насоса и хроматографической колонки. Для удаления этих примесей используется владипоровская мембрана МФА-МА № 2 (ТУ 8-05-1903-84) с размером пор 0,15 — 0,25 мкм или мелкопористый стеклянный фильтр. Элюент перед работой необходимо продегазировать в течение 10 минут. Для этого используется ток газообразного гелия (ТУ 51-940-80) при расходе 40 — 50 мкл/мин, обработка на ультразвуковой бане или вакуумный насос.

15.4. АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИХ УДЕРЖИВАНИЯ

Тестовая модельная смесь гидазепама, оксазепама, нитразепама, хлордиазепоксида, феназепама и диазепама готовится в растворе подвижной фазы. Для этого:

а) берутся навески гидазепама (25 ± 1 мг), оксазепама (28 ± 0,5 мг), нитразепама (55 ± 0,5 мг), хлордиазепоксида (75 ± 1 мг), феназепама (19 ± 0,5 мг) и диазепама (50 ± 1 мг);

б) навески переносятся в колбу 50 $см^3$, объем доводится до метки, смесь встряхивается до полного растворения и фильтруется. Смесь должна сохраняться при + 4°С.

Хроматографирование модельной смеси проводится при следующих условиях: расход элюента — 100 мкл/мин; объем вводимой дозы — 2 мкл; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; время измерения — 0,4 с; длина волны — 230 нм. Хроматограмма анализа модельной смеси приведена на рис. 53, а основные хроматографические параметры — в табл. 49.

Таблица 49. **Основные хроматографические параметры разделения 1,4-бензодиазепинов**

Вещество	Коэффициент емкости, K' $K' = \frac{V_R - V_0}{V_0}$	Селективность $\alpha = K'_2 / K'_1$						Степень разделения $R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{M_{0,5(1)} + M_{0,5(2)}}$			
		2/1	3/2	4/3	5/4	6/5	6/1	2/1	3/2	4/3	5/4
Гидазепам	1,75	1,39	-	-	-	-	-	1,67	-	-	-
Нитразепам	2,44	-	1,19	-	-	-	-	-	1,5	-	-
Оксазепам	2,91	-	-	1,34	-	-	-	-	-	1,86	-
Хлордиазепоксид	3,89	-	-	-	1,78	-	-	-	-	-	3,9
Феназепам	6,85	-	-	-	-	1,45	-	-	-	-	-
Диазепам	9,95	-	-	-	-	-	5,69	-	-	-	-

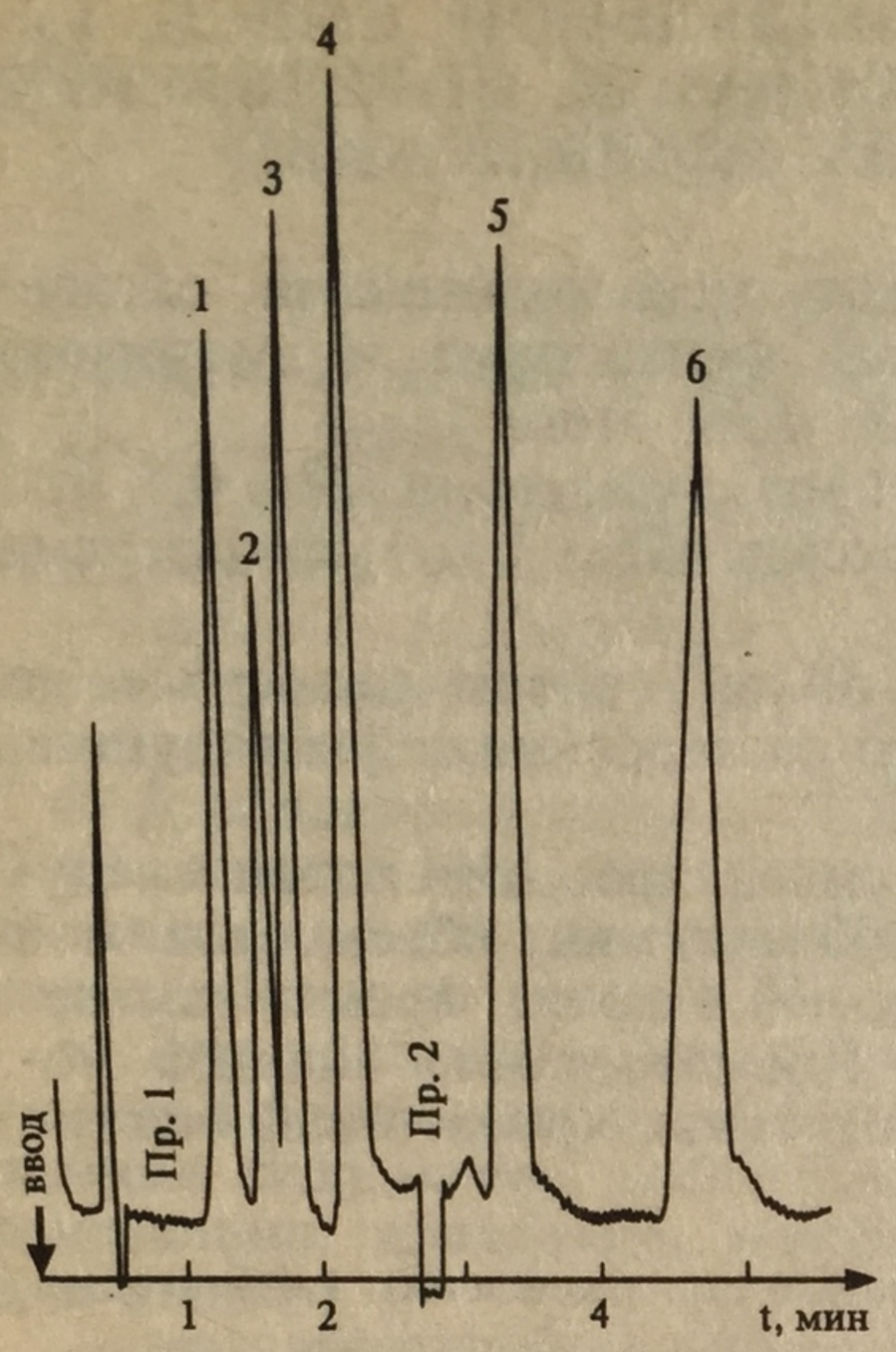
Примечание. V_R — объем удерживания, мкл; V_0 — объем удерживания несорбируемого вещества (нитрат натрия), мкл; K'_1 и K'_2 — коэффициенты емкости первого и второго вещества; Δt — разность времени удерживания разделяемых соседних веществ, мм; $\omega_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты, мм.

Контрольная модельная смесь АНБ, АХБ, АБХБ, медазепама и МХБ готовится в растворе подвижной фазы. Для этого:

а) берутся навески АНБ, АХБ, АБХБ, МХБ и медазепама по 30 ± 1 мг;

б) навески переносятся в колбу 50 $см^3$, объем доводится до метки, смесь встряхивается до полного растворения и фильтруется; сохраняется при + 4°С.

Хроматографирование модельной смеси проводится при следующих условиях: расход элюента — 100 мкл/мин; объем вводимой



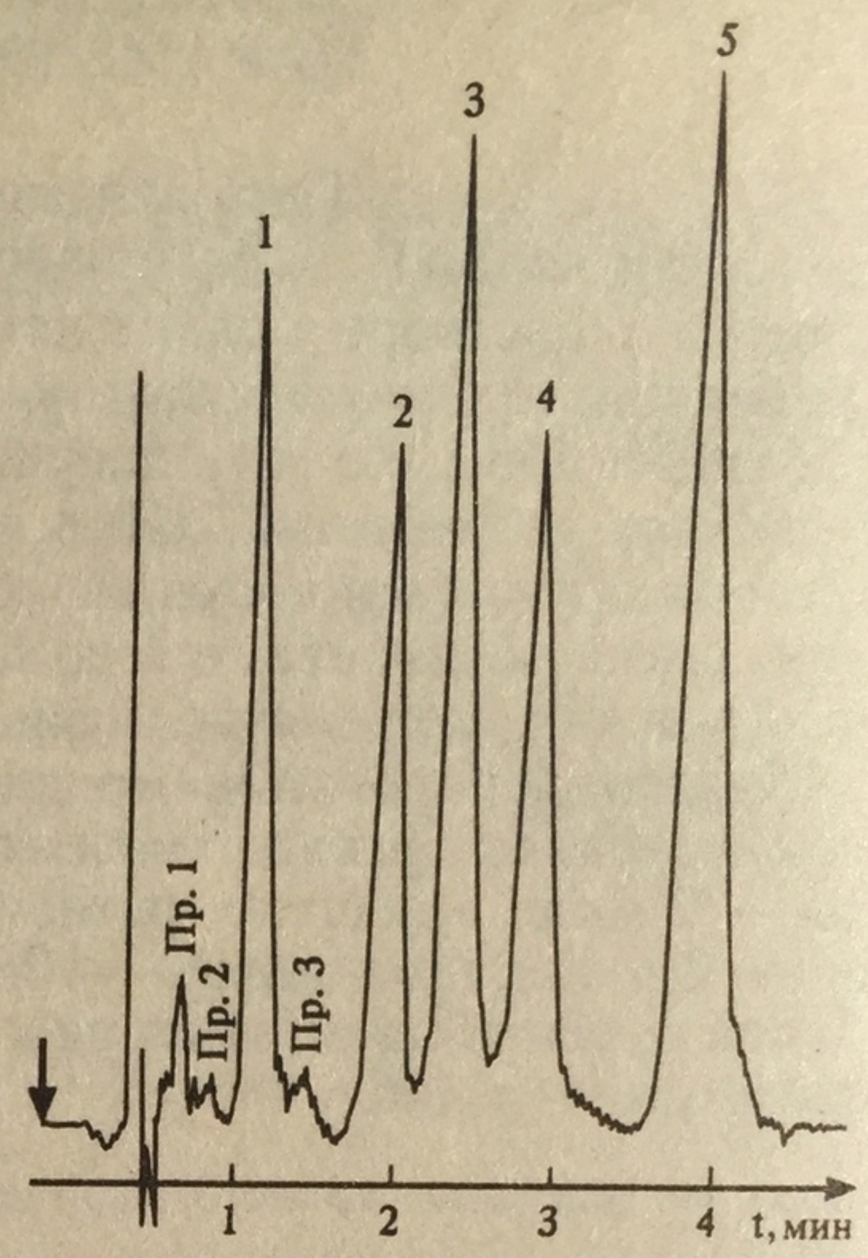


Рис. 53. Хроматограмма модельной смеси 1,4-бензодиазепинов: 1 — гидазепам; 2 — оксазепам; 3 — нитразепам; 4 — хлордиазепоксид; 5 — феназепам; 6 — диазепам; Пр. 1 — неидентифицированная примесь в хлордиазепоксиде; Пр. 2 — неидентифицированная примесь.
"Милихром"; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; время измерения — 0,3 с; величина вводимой дозы — 2 мкл; λ — 230 нм

Рис. 54. Хроматограмма модельной смеси бензофенонов: 1 — АНБ; 2 — АХБ; 3 — АБХБ; 4 — медазепам; 5 — МХБ; Пр. 1, Пр. 3 — неидентифицированные примеси; Пр. 2 — неидентифицированная примесь в АБХБ. "Милихром-2"; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; время измерения — 0,4 с; величина вводимой дозы — 2 мкл; λ — 220 нм

дозы — 2 мкл; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; время измерения — 0,4 с; длина волны — 220 нм. Хроматограмма анализа модельной смеси бензофенонов и медазепама приведена на рис. 54, а основные хроматографические параметры — в табл. 50.

Таблица 50. **Основные хроматографические параметры разделения бензофенонов и медазепама**

Вещество	Коэффициент емкости (K')	Селективность (α)					Степень разделения (R_s)			
		2/1	3/2	4/3	5/4	5/1	2/1	3/2	4/3	5/4
АНБ	1,73	2,22	-	-	-	-	2,62	-	-	-
АХБ	3,85	-	1,24	-	-	-	-	1,21	-	-
АБХБ	4,77	-	-	1,28	-	-	-	-	1,18	-
Медазепам	6,09	-	-	-	1,42	-	-	-	-	2,32
МХБ	8,62	-	-	-	-	4,98	-	-	-	-

15.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Предел обнаружения анализируемого вещества определяется по величине такого количества вещества, которое вызывает сигнал, превышающий в 5 раз уровень флюктуационных шумов, который на шкале чувствительности 0,1 е.о.п. (для хроматографов "Милихром-2" и "Милихром-4") и 0,4 е.о.п. (для хроматографа "Милихром") составляет 2 мл. Отсюда минимальное значение сигнала $h_{мин}$=2 мм × 5. Значения пределов обнаружения ($G_{мин}$, мг) рассчитываются по формуле

$$G_{мин} = \frac{h_{мин} \cdot C \cdot qM}{h_i \cdot M_i},$$

где

C — концентрация анализируемого вещества;

q — объем вводимой дозы, мкл;

h_i — высота пика анализируемого вещества на шкале чувствительности M_i, мм;

M — масштаб чувствительности при определении уровня флюктуационных шумов;

M_i — масштаб чувствительности при анализе.

Пределы обнаружения гидазепама, нитразепама, оксазепама, хлордиазепоксида, феназепама, диазепама и медазепама на хроматографе "Милихром-2" приведены в табл. 51.

Таблица 51. **Пределы обнаружения бензодиазепинов**

Вещество	Предел обнаружения ($G_{мин}$) · 10^{-6}, мг
Гидазепам	6,5
Оксазепам	3,4
Нитразепам	11,1
Хлордиазепоксид	17,8
Феназепам	13,3
Диазепам	15,0
Медазепам*	12,5

* Медазепам определяется в условиях, отличных от остальных бензодиазепинов (см. п. "Бензофеноны").

15.6. АНАЛИЗ БИОПРОБ НА СОДЕРЖАНИЕ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНОВ

Сухой экстракт, полученный после пробоподготовки биологического объекта, растворяют в 100 мкл подвижной фазы и 4 мкл вводят в хроматографическую колонку.

15.6.1. Качественный анализ

Идентификация бензодиазепинов и бензофенонов, содержащихся в биопробах, производится следующим образом:

а) сопоставляются время (объемы) удерживания и коэффициенты емкости определяемого компонента и образцов сравнения (эталонный раствор) индивидуальных бензодиазепинов и бензофенонов;

б) сопоставляются УФ-спектры определяемого компонента и образцы сравнения (на рис. 55 и 56 приведены УФ-спектры нитразепама, хлордиазепоксида, АНБ и АХБ в растворе подвижной фазы);

в) оценивается совпадение значений времени удерживания определяемого компонента и образца сравнения при добавлении эталонного раствора в раствор экстракта из биопробы (концентрация образца сравнения должна быть близка к концентрации определяемого компонента) (рис. 57);

г) сопоставляются УФ-спектры определяемого компонента и образца сравнения при двух длинах волн, и оценивается их спектральное отношение.

На рис. 58, 59 приведены примеры хроматограмм экстрактов из мочи, желудка, кишечника, печени, почек, полученных на хроматографах "Милихром" и "Милихром-2". В экспертном материале обнаружены диазепам, оксазепам, медазепам, МХБ.

15.6.2. Количественный анализ

Для количественного анализа бензодиазепинов и бензофенонов в биопробах можно использовать различные методы, в том числе метод добавки, метод внешнего стандарта, метод внутреннего стандарта и т.д.

а) *Метод добавки.* В соответствии с методом добавки проводят анализ раствора экстракта биопробы и этого же раствора, но с добавкой в него раствора известной концентрации предполагаемого бензодиазепина или бензофенона (эталонного раствора). Анализы растворов "без добавки" и "с добавкой" должны проводиться в одном масштабе регистрации.

Концентрация определяемого вещества (C_i) в растворе экстракта из биопробы определяется по формуле

$$C_i = \frac{C_k V_k / (V_i + V_k)}{\frac{h_{i+k}}{h_i} - 1},$$

где

C_k — концентрация "добавки" в растворе подвижной фазы;

V_k — объем добавленного эталонного раствора;

V_i — объем раствора экстракта с определяемым веществом;

h_i — высота сигнала определяемого вещества в растворе экстракта из биопробы;

h_{i+k} — высота сигнала определяемого вещества после добавки в раствор экстракта эталонного раствора.

б) *Метод внешнего стандарта.* В соответствии с методом внешнего стандарта и с учетом линейной зависимости выходного сигнала от массы вещества последовательно, вслед за анализом раствора экстракта биопробы проводят анализ эталонного раствора идентифицируемого вещества. Концентрация эталонного раствора (C_k) должна быть близка к концентрации определяемого вещества в растворе экстракта. Анализ эталонного раствора и экстракта биопробы должен производиться в одном масштабе регистрации.

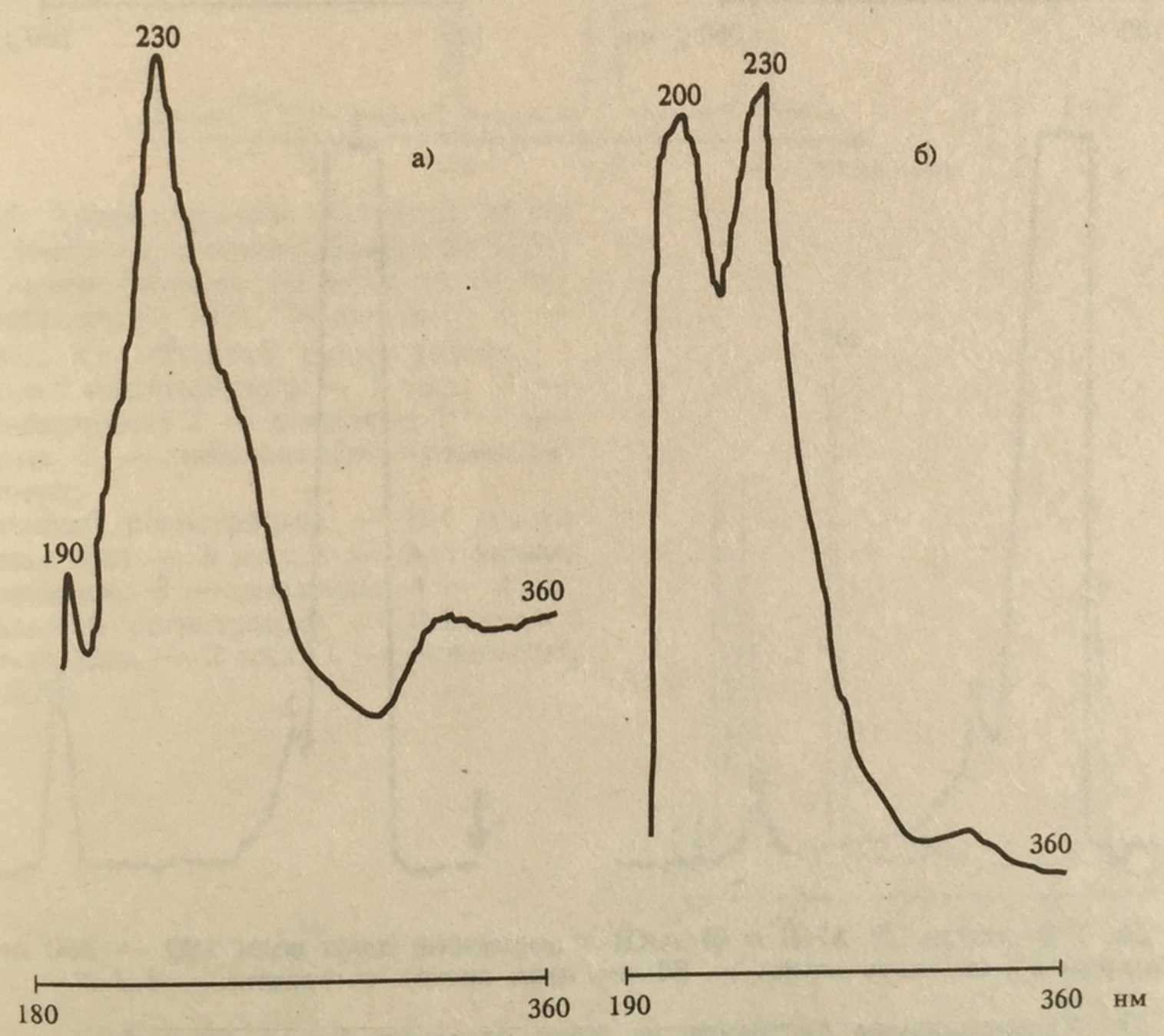


Рис. 55. УФ-спектр: а) нитразепама и б) хлордиазепоксида в диапазоне длин волн 190 — 360 нм. "Милихром-1"; скорость ленты — 30 мм/мин; время измерения — 1,2 с

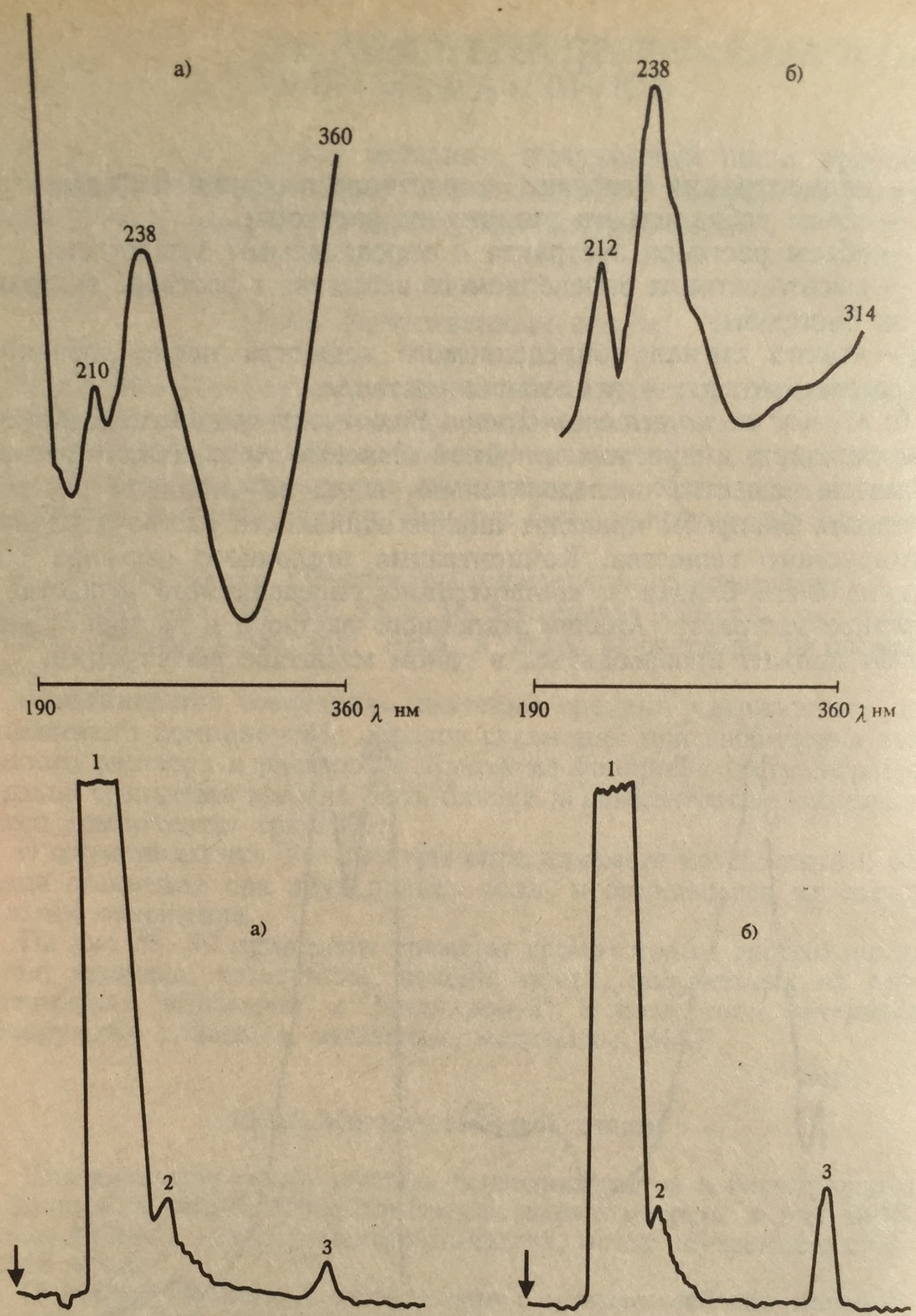


Рис. 56. УФ-спектр: а) АНБ и б) АХБ в диапазоне длин волн 190 — 360 нм. "Милихром-2"; скорость ленты — 30 мм/мин; время измерения — 1,2 с

Рис. 57. Хроматограмма экстракта из мочи пациента Г.: а) без добавки и б) с добавкой в экстракт АБХБ. "Милихром-2"; концентрация эталонного раствора— 0,025 мг/мл; масштаб регистрации — 0,2 е.о.п.; вводимая доза — 2 мкл; λ — 220 нм; 1,2 — фон мочи; 3 — АБХБ

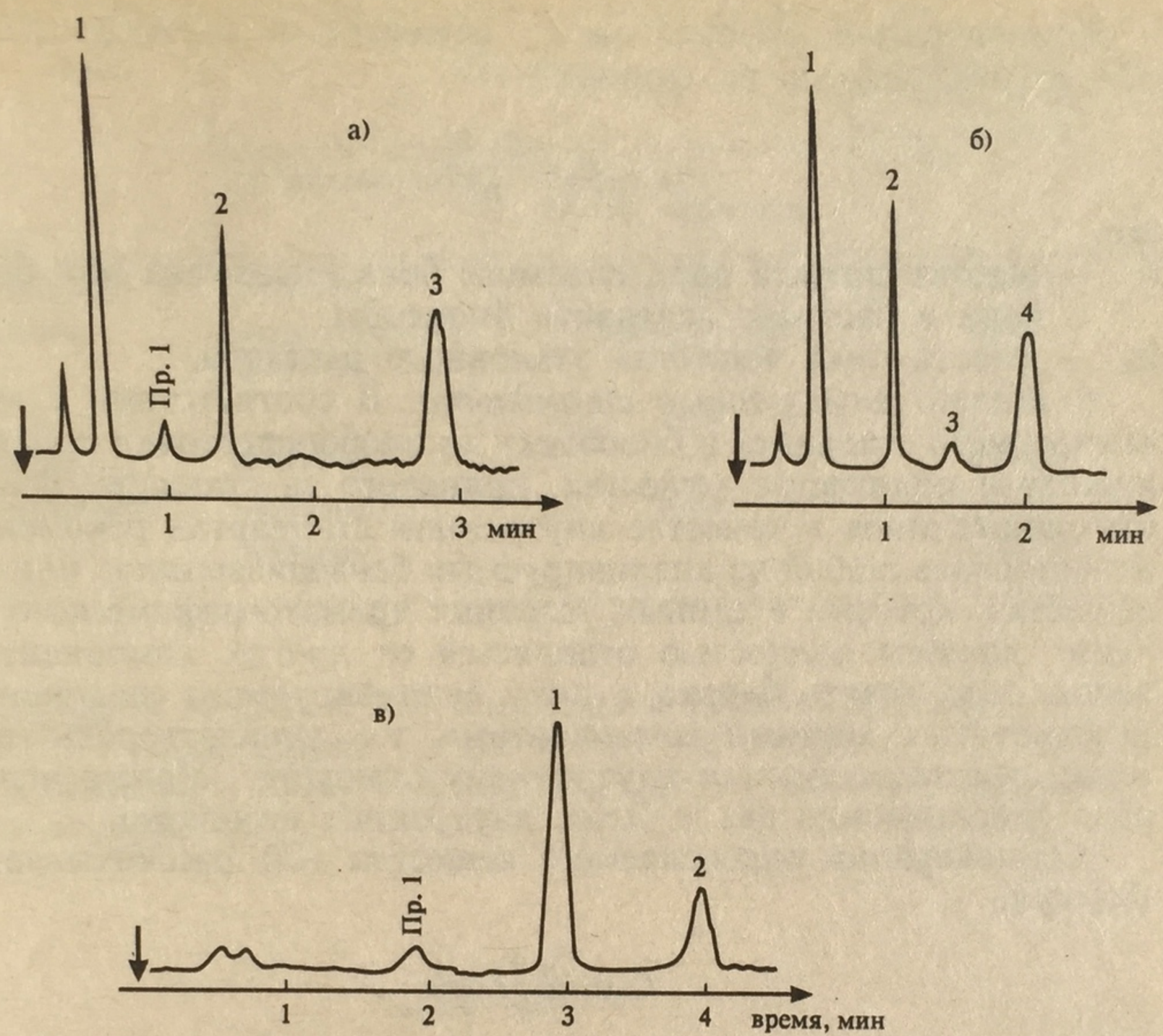


Рис. 58. Хроматограмма экстракта: а) из содержимого кишечника (образец № 173); б) из почки (образец № 542); в) из печени (образец № 542). "Милихром"; λ — 230 нм; а) масштаб регистрации — 0,2 е.о.п.; вводимая доза — 5 мкл; 1 — фон кишечника; 2 — диазепам; 3 — медазепам; 1 — неидентифицированный компонент;
б) масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 3 мкл; 1 — фон почки; 2 — нозепам; 3 — диазепам; 4 — АХБ;
в) масштаб регистрации — 0,2 е.о.п.; вводимая доза — 2 мкл; 1 — медазепам; 2 — МХБ

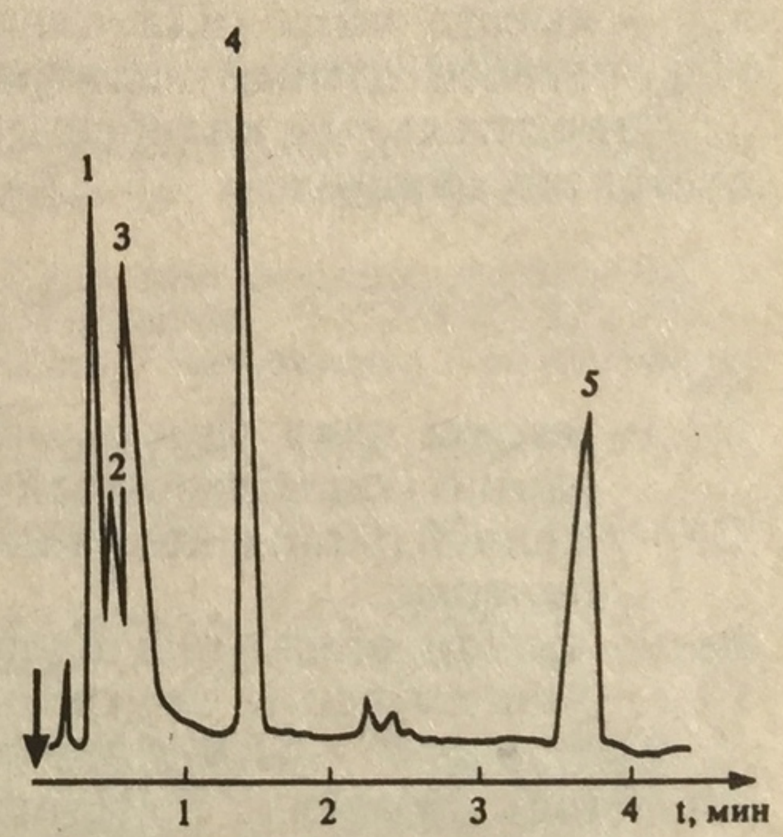


Рис. 59. Хроматограмма экстракта из содержимого желудка (образец № 436); "Милихром-1"; масштаб регистрации — 0,4 е.о.п.; вводимая доза — 4 мкл; λ — 230 нм; 1, 2, 3 — фон желудка; 4 — диазепам; 5 — МХБ

Концентрация определяемого вещества в растворе экстракта (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_k \cdot h_i}{h_k},$$

где

h_i — высота сигнала определяемого бензодиазепина или бензофенона в растворе экстракта биопробы;

h_k — высота пика вещества эталонного раствора.

в) *Метод внутреннего стандарта.* В соответствии с методом внутреннего стандарта в биообъект до пробоподготовки добавляется известное количество вещества, принятого за стандарт. В анализе бензодиазепинов в качестве внутренних стандартов рекомендуется использовать любой из анализируемых бензодиазепинов или другие вещества, которые в данных условиях хроматографического разделения должны полностью отделяться от других компонентов образца, элюировать близко к пику анализируемого соединения, не реагировать с другими компонентами, т.е. удовлетворять требованиям, предъявляемым к внутреннему стандарту. Можно использовать одновременно два и более внутренних стандарта.

Концентрация определяемого вещества (C_i) рассчитывается по формуле

$$C_i = \frac{C_{вс} \cdot h_i}{h_{вс}} \cdot \frac{1}{F_{i/вс}},$$

где

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта;

h_i — высота пика (или площадь) определяемого вещества;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) стандарта;

$F_{i/вс}$ — относительный калибровочный фактор.

Относительный калибровочный фактор компонента $F_{i/вс}$ вычисляется по формуле

$$F_{i/вс} = \frac{h_i \cdot C_{вс}}{C_i \cdot h_{вс}},$$

где

h_i — высота пика (или площадь) компонента известной концентрации (калибровочный раствор);

C_i — концентрация калибровочного раствора определяемого компонента;

$h_{вс}$ — высота пика (или площадь) внутреннего стандарта;

$C_{вс}$ — концентрация внутреннего стандарта.

Содержание АБХБ в экстрактах из мочи (рис. 57) определялось по методу добавки и по методу внешнего стандарта (концентрация эталонного раствора образца сравнения — 0,025 мг/мл). Концентрация АБХБ в экстракте из мочи, рассчитанная по методу добавки (рис. 57), составила 0,033 мг/мл, а методом внешнего стандарта — 0,030 мг/мл. В табл. 52 приведены результаты анализа экспертного материала.

Таблица 52. **Концентрации бензофенонов в экспертном материале**

Образец, №	Орган	Обнаружено		Концентрация 1,4-бензодиазепина в пробе, мг/мл
		1,4-бензодиазепин	бензофенон (после гидролиза)	
436	желудок	диазепам	МХБ	0,060
542	почка	медазепам, диазепам	МХБ и АХБ	0,050
			АХБ	
542	печень	оксазепам	—	0,003
173	кишечник	медазепам,	МХБ	0,015
		диазепам		0,005

В образцах № 542 и 173 определены помимо основного бензодиазепина — медазепама также и его метаболиты — диазепам (173) и оксазепам (542), что подтверждается анализом гидролизованных экстрактов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Clark E.G.C.* Isolation and Identification of Drugs. London, 1975. Vol.2.
2. *Schütz H.* Benzodiazepines: A Handbook. Springer Verlag. Berlin; Heidelberg; New York, 1982. P. 277.
3. *Богатский А.В., Андронати С.Я., Головенко Н.Я.* Транквилизаторы. Киев: "Наукова думка", 1980.
4. *Лощинин А.Н.* Газохроматографический анализ производных 1,4-бензодиазепина в биологических жидкостях: Автореферат на соискание ученой степени канд.фарм.наук. М., 1980.
5. *Изотов Б.Н., Волкова И.В., Андрияко Т.Б.* Методические указания об определении хлозепида и нитразепама в трупном материале. М.: МЗ СССР, 1986.
6. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание: Методические указания. М.: МЗ СССР, 1989.
7. *Maznar M., Binder S.R.*//Journal of Chromatography. 1989. Vol.497. P.201.
8. *Ascolone V.*//Journal of Chromatography. 1980. Vol.181. P.141.
9. *Koenigbayer M.J., Asseuza S.P., Willoughby R.S., Curtis M.A.*//Journal of Chromatography. 1987. Vol. 413. P. 161.
10. *Perchalski R.J., Wilder B.J.*//Analytical Chemistry. 1978. Vol.50. P.554.
11. *Ratnary N., Goldberg V.D., Elyas A., Lascelles P.T.*//Analyst. 1981. Vol.106. P. 1001.
12. *Lloyd J.B.F., Parry D.A.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol.449. P.281.
13. *Lloyd J.B.F., Parry D.A.*//Journal of Analytical Toxicology. 1989. Vol.13. P.163.
14. *Mura P., Pirion A., Frailloni P. e.a.*//Journal of Chromatography. 1987. Vol.416. P. 303.
15. *Suzuki K., Johno I., Kitazami S.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol.425. P. 435.
16. *Koenigbayer M.J., Curtis M.A.*//Journal of Chromatography. 1988. Vol.427. P. 277.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Энгельгардт Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях/Под ред. К.В. Чмутова. М.: "Мир", 1980. 237 с.

2. *Шатц В.Д., Сахартова О.В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: "Зинатне", 1988. 390 с.

3. *Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: "Химия", 1986. 288 с.

4. ВЭЖХ в биохимии / Под ред. А. Хеншен и др. М.: "Мир", 1988. 303 с.

5. *Схунмаркерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии/Под ред. В.А. Даванкова. М.: "Мир", 1989. 339 с.

Таблица 53. ВЭЖХ-анализ барбитуратов

Таблица 53. **ВЭЖХ-анализ барбитуратов**

Анализируемый объект	Вид и объем вводимой пробы, q мкл	Детектор (предел детектирования (ПД), линейный диапазон (ЛД), шкала)	Условия анализа (сорбент, подвижная фаза (ПФ), размер колонки, скорость потока, (F), режим)	Способ подготовки пробы (экстракция, осаждение, депретирование, центрифугирование, прямой ввод пробы)	Способ обработки результатов (внутренний стандарт (ВС); абсолютная градуировка, метод нормализации, количество измерений, погрешность)	Используемый стандарт	Ссылка на основную литературу
1	2	3	4	5	6	7	8
12 барбитуратов	Образец: моча, плазма крови, трупная кровь, содержимое желудка, ткани организма, q=15 мкл	УФ-детектор; ПД=6 нг; ЛД=1 — 100 мкг/мл; минимальная определяемая концентрация для барбитала, фенобарбитала: $C_{мин}$=0,05 мкг/мл (в плазме); $C_{мин}$=0,03 мкг/мл (в крови). Для других барбитуратов — соответственно 0,1 и 0,07 мкг/мл. Шкала: 0,05 е.о.п.	Сорбент — μ-Бондапак C_{18}, 5 мкм (150x3,9 мм), ПФ=водный $(NH_4)_2HPO_4$—метанол (60 : 40). F=1 мл/мин. Давление — 88 атм. λ=240 нм	Сыворотка крови, плазма, моча: к 0,5 мл сыворотки, плазмы или крови добавляют 0,5 мл фосфатного буфера (0,5 М, pH=5,5),50 мкл внутреннего стандарта и 6 мл метиленхлорида. После перемешивания и центрифугирования органическая фаза декантируется, упаривается досуха при 45°С. Сухой остаток растворяется в 100 мкл ПФ, и 15 мкл вводятся в колонку. Трупная кровь: к 1 мл трупной крови или ткани (1 часть ткани на 1 часть воды) добавляется 1 мл фосфатного буфера, 100 мкл внутреннего стандарта и 12 мл метиленхлорида. После встряхивания и центрифугирования органическая фаза декантируется. Водная фаза подвергается экстракции вторично. Органические фазы объединяются, упари-	* Базовый раствор барбитуратов в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. ** Рабочие растворы барбитуратов в метаноле— 10 мкг/мл и 100 мкг/мл. *** Контрольные растворы в моче, плазме, трупном материале с концентрациями 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл с последующей пробоподготовкой. Для каждого барбитурата (в раствор биопробы добавляются 50 мкг/мл внутреннего стандарта) строится зависимость $S_i / S_{BC} - C_i / C_{BC}$. Коэффициент корреляции кривых не превышает 0,97. Сходимость (n=6) для концентрации 1 мкг/мл — 10%, для 10 мкг/мл — 3%. Воспроизводимость за 3 недели для концентрации 5 мкг/мл — 8%	1) ВС— апробарбитал (раствор в метаноле — 50 мкг/мл) 2) ВС— фенолфталеин (раствор в метаноле — 1 мг/мл)— внутренний стандарт для тиопентала	(1)

1	2	3	4	5	6	7	8
				ваются досуха. Сухой остаток растворяют в 100 мкл ПФ, 15 мкл вводят в колонку. Степень извлечения при стадии экстракции оценивается для каждого из барбитуратов при сравнении площади пика вещества в пробе с площадью пика того же вещества в растворе метанола при одной концентрации (по приготовлению). Для растворов барбитуратов в биопробе с концентрацией 10 мкг/мл выход составляет 58 — 70%, для концентрации 1,5 мкг/мл — 75—80%			

* Базовый раствор — исходный раствор анализируемого вещества в растворителе, мг/мл.
** Рабочий раствор — раствор, получаемый при разбавлении базового растворителем в n раз, мкг/мл.
*** Контрольный раствор — раствор, получаемый при разбавлении рабочего биологической жидкостью в n раз, мкг/мл.

Фенобарбитал (ФБ) совместно с фенитоином и их основными метаболитами: 5-п-гидроксиф-5-гидантоином и п-гидроксифенобарбиталом (ГФБ)	Образец: сыворотка, моча, ткани мозга крыс, q=20 мкл	ЛД$_{ФБ}$ =5 — 200 мкг/мл ЛД$_{ГФБ}$ = 0,25 — 80 мкг/мл УФ-детектор	Сорбент для аналитической колонки Сферисорб ODS, 5 мкм (250x4,6 мм). Предколонка— силикагель Si-600(50x4,6мм), ПФ-ацетонитрил-фосфатный буфер (pH=4,0) (28 : 72);	Сыворотка: к 200 мкл сыворотки добавляется 2 капли 3 н HCl, 2,5 мл третбутилметилового эфира, 200 мкл раствора внутреннего стандарта (15 мкг/мл) и избыток сульфата аммония. После встряхивания органическая фаза декантируется, упаривается досуха при 65°С. Сухой остаток растворяется в 50 мкл ПФ, и 20 мкл вводится в хроматограф.	Базовые растворы ФБ и ГФБ в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. Рабочие растворы ФБ и ГФБ готовят из базового разбавлением биологической жидкостью: для ФБ в моче — 60 мкг/мл, в тканях головного мозга— 200 мкг/мл; для ГФБ в моче — 8 мкг/мл, в тканях мозга — 80 мкг/мл. Контрольные растворы получают из рабочих при	ВС-п-метилфенобарбитал (раствор в воде с концентрациями 15, 30 и 60 мкг/мл)	(2)

1	2	3	4	5	6	7	8
			F=2 мл/мин; λ=195 нм	Ткани мозга: к 1 мл гомогенизированной смеси	разбавлении их водой: для мочи — ФБ: 5, 10,		

1	2	3	4	5	6	7	8
			F=2 мл/мин; λ=195 нм	Ткани мозга: к 1 мл гомогенезированной смеси добавляется 100 мкл раствора внутреннего стандарта, 3 капли 6 н HCl, 5 мл третбутилметилового эфира и избыток сульфата аммония. После встряхивания и центрифугирования органический слой сливается. 4 мл этой фазы упаривают досуха. Остаток растворяют в 50 мкл метанола и 20 мкл вводят в колонку. Потери при пробоподготовке не превышают 5%	разбавлении их водой: для мочи — ФБ: 5, 10, 20, 40 и 60 мкг/мл, ГФБ: 0,25, 1, 2, 4 и 8 мкг/мл; для головного мозга — ФБ: 25, 50, 100, 150 и 200 мкг/мл; ГФБ: 10, 20, 40, 60 и 80 мкг/мл. Хроматографическому анализу биопроб предшествует пробоподготовка. Параллельно проводился прямой анализ (без пробоподготовки) водных растворов этих веществ в том же диапазоне концентраций. Коэффициенты корреляции зависимости C_i в воде — C_i в биопробе: для ФБ — 0,999; для ГФБ —0,998. Коэффициенты регрессии для ФБ: а=0,077, в=0,022; для ГФБ: а=0,150; в=0,005. Сходимость (n=5) для ФБ— 2,3; 1,4; 0,7% для концентраций 5,0; 20; 60 мкг/мл; для ГФБ—3,6; 2,0; 1,1% для концентраций 0,25; 2,0; 8,0 мкг/мл.		
Фенобарбитал (ФБ) и его метаболиты; п-гидро-	Образец: моча пациентов неврологической клиники,	УФ-детектор $ЛД_{ФБ}$=5 — 200 мкг/мл,	Сорбент— Ультрасфер ODS (5 мкм) (250x4,6мм); предколонка	К 200 мкл мочи добавляется 4 мкг ВС (20 мкл рабочего раствора с концентрацией 200 мкг/мл), 1 мл насыщенного раствора сульфата аммония,	Базовые растворы внутреннего стандарта, ФБ, ГФБ и ФНБ в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. Рабочие растворы — из базовых в метаноле; для	5-метил-5-фенилгидантоин (раствор в метаноле	(3)

1	2	3	4	5	6	7	8
ксифенобарбитал (ГФБ) и 1-β—D-глюкопиранозилфенобарбитал (ФНБ)	принявших дозы ФБ 60 — 120 мкг/мл, q=20 мкл	ЛД$_{ФНБ}$ =2 — 120 мкг/мл, ПД=1 мкг/мл (для всех веществ). Шкала — 0,05 е.о.п.	— C_{18} (7 — 50мкм) (32x4 мм), ПФ-ацетонитрил — 0,025 М натрийфосфатный буфер (pH=7,0) λ=204 нм, F=1,4мл/мин $V_{ленты}$= 0,25см/мин. Удерживание ($t_{уд}$,мин) : ГФБ, ФНБ, ВС, ФБ: 7,0; 9,4; 11,5; 21,6	2 мл этилацетата. После перемешивания, центрифугирования органический слой декантируется, упаривается досуха. Сухой остаток растворяется в 200 мкл, вводится в хроматограф. Извлечение ФБ и метаболитов определялось на контрольной смеси в бланковой моче с содержанием ФБ=50 и 200 мкг/мл; ГФБ и ФНБ=30 и 120 мкг/мл. Степень извлечения при пробоподготовке рассчитывается по сопоставлению с данными прямого ввода эквивалентных количеств в водном растворе к ВС. Среднее значение извлечения составляет: для ФБ — 100,6±0,1%; для ГФБ— 96,8±0,2%; для ФНБ— 81,1±4,1%	ФБ — 200 и 50 мкг/мл; для ГФБ — 120 и 30 мкг/мл; для ФНБ—120 и 30 мкг/мл; для вн.ст. — 200мкг/мл. Контрольные растворы готовятся путем разбавления мочой рабочих растворов после упаривания метанола в потоке азота. Контрольные растворы в моче готовились в диапазоне концентрации: для ФБ — 5—200 мкг/мл; для ГФБ—2—120 мкг/мл; для ФНБ—2—120 мкг/мл. Анализу растворов предшествует пробоподготовка. Сходимость анализов для смеси в моче с концентрациями: ФБ — 80 мкг/мл, ГФБ и ФНБ — 60 мкг/мл (n=8, соответственно 5; 5,8; 4,7%). Воспроизводимость в течение 5 дней = 5,5; 3,0; 5,6%. Калибровочные графики для контрольных растворов ФБ, ГФБ и ФНБ в моче: $h_i / h_{ВС} - C_i / C_{ВС}$. Коэффициент корреляции — 0,997	4 мкг (20 мкл рабочего раствора в метаноле с конц. 200 мкг/мл)	
15 барбитуратов	Образец: сыворотка крови и слюна добровольца,	УФ-детектор ЛД$_i$ =20 — 500 нг, ПД$_i$=2,4 нг	Сорбент— Лихросорб S_i 600, модифицированный диме-	К 1 мл сыворотки крови или слюны добавляется 3,5 мг внутреннего стандарта, 2 мл ацетатного буфера 0,001 М (pH=5,5),	Для гексабарбитала контрольные растворы готовились в диапазоне 1-12 мкг/мл. Сходимость для концентрации	ВС—амобарбитал (3,5 мг). ВС добавляется в	(4)

1	2	3	4	5	6	7	8
	принявшего 400 мг гексабарбитала (Г), и больного, принимавшего барбитураты регулярно; q=104 мкл		тилхлорсиланом (316x2,8 мм). ПФ—метанол—вода (25 : 75; 30 : 70; 40 : 60; 50 : 50). Удерживание барбамила (Б) и этаминала натрия (Э) для указанных ПФ следующее: $K_Б$ = 33,6; 22,9; 9,39; 3,69; K′= 35,0; 24,3; 9,49; 3,80. Предколонка с силикагелем S_i=60 (63—200 мкм) (500x9 мм). λ=220 нм	10 мл смеси гексана—эфира—н — пропанола (49:49:2). После перемешивания, центрифугирования органическая фаза отделяется, упаривается досуха, растворяется в 500 мкл ПФ; 104 мкл вводят в хроматограф. Степень извлечения гексабарбитала и секобарбитала из водного раствора и из сыворотки составляет 90 и 95%. Для фенобарбитала — соответственно 70 и 50%	50 мкг/мл — 0,3%; для 5 мкг/мл — 3%; для 0,05 мкг/мл — 15%. Чувствительность методики к гексабарбиталу (коэффициент пропорциональности) — K =5,29 мк V сек/мг. Коэффициент корреляции этой прямой — 0,99984. Предел определения для "Г" устанавливается как величина сигнала, превышающая шум в 3 раза (при надежности 99,7%). После приема 400 мг "Г" содержание в сыворотке крови через 6 ч — 160 нг, в слюне через 2,5 ч — 160 нг	сыворотку крови или слюны	
Амилобарбитал (барбамил), бутобарбитал, циклобарбитал, пентобарбитал (этаминал Na), хинобарбитал	Образец: кровь пяти добровольцев, q=200 мкл	УФ-детектор, шкала 0,01—0,02 е.о.п.; ПД ≤ 1 мкг/мл; для всех барбитуратов $ЛД_{пентобарб.}$= 1 — 200 мкл/мл	Сорбент—Гиперсил ODS(5 мкм), (100x5 мм) ПФ: метанол-дигидрофосфат Na 0,1 М (pH=8,5) (40 : 60); λ=240 нм;	К 100 мкл крови добавляется 20 мкл внутреннего стандарта (раствор в этаноле 25, 61 мкг/мл); до 1 мл разбавить фосфатным буфером (0,1 М; pH=7,5), затем 5 мл экстрагента — гексан—диэтиловый эфир (50 : 50). После перемешивания, центрифугирования органиче-	Калибровочные растворы готовятся в метаноле и в холостой сыворотке крови с содержанием (мкг/мл): $C_А$=8,4; $C_Б$=7,5; $C_ц$=12,9; $C_П$=10,1; $C_Х$=8,2 Растворы в холостой крови перед анализом подвергаются пробоподготовке. Сходимость опреде-	ВС—талбутал (1 метилпропилаллилбарбитуровая кислота)—20 мкл (раствор в этаноле 25,61 мкг/мл)	(5)

1	2	3	4	5	6	7	8
			давление — 116 атм; $t_{уд.барбам.}$= 5 мин; $t_{уд.пентобарб.}$= 6 мин	ский слой декантируют (4 мл), выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 500 мкл ПФ и 200 мкл вводят в хроматограф. Извлечение указанных барбитуратов рассчитывалось по отношению к внутреннему стандарту прямого ввода метанольных растворов эквивалентных количеств. Степень извлечения указанных барбитуратов из сыворотки крови составляет 94,2 — 99,2%	ления хинобарбитала (n=6) для концентраций 4,52 и 47,4 мкг/мл соответственно 2,9 и 1,5%. Содержание пентабарбитала (этаминала Na) в венозной крови после приема 182 мг через 2 ч— 3,15 мкг/мл; через 8 ч — 2,26 мкг/мл. Содержание циклобарбитала в крови после приема 182 мкг через 2 ч — 0,86 мкг/мл; через 8 ч —2,95 мкг/мл		
Аллобарбитал (А), фенобарбитал (Ф), бутабарбитал (Ба), бутабитал (Би), пентобарбитал (П)	Образец: плазма крови q=25 мкл	УФ-детектор	Сорбент — μ — Бондапак C_{18} (5 мкм) (150x3,9 мм); ПФ—вода—ацетонитрил — 1,75 М фосфорная кислота (798 : 200 : 2); λ=195 нм, F=0,8мл/мин; время удерживания (мин): Барбитал (ВС) — 3,9, А — 6,3, Ф — 9,1,	К 0,4 мл плазмы, содержащей барбитураты, добавляют 0,2 мл 1н HCl, 4 мл хлороформа. После перемешивания, центрифугирования 3,5 мл органического слоя декантируют, упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл ПФ и добавляют 0,1 мл вн.ст. После перемешивания 25 мкл смеси вводят в хроматограф. Степень извлечения указанных барбитуратов из плазмы оценивалась по сравнению с данными анализа этих барбитуратов в ПФ и сос-	Базовые растворы в этаноле — концентрация в 1 мкг/мл. Рабочие растворы готовятся на базовых разбавлением ПФ в диапазоне 1—20 мкг/мл. Контрольные растворы— в плазме концентрацией 1, 2,5, 5, 7,5, 10 и 20 мкг/мл. К каждому добавляется 1,67 мкг вн.ст. Перед анализом проводится пробоподготовка растворов плазмы с барбитуратами. Калибровочные графики строятся для каждого вещества: $S_i / S_{ВС} - C_i / C_{ВС}$. Сходимость по барбитуратам 3,5—4,5%	ВС—барбитал с конц. 10 мкг/мл	(6)

1	2	3	4	5	6	7	8
			Ба — 10,5,	тавляет для (А) 65%,			

1	2	3	4	5	6	7	8
			Ба — 10,5, Би — 12,3, П — 18,9	тавляет для (А) 65%, для (Ф) — 81%, для (Ба) — 73%, для (Би) — 75%, для (П) — 91%			
Фенобарбитал(Ф) в смеси с бензоналом(Б), галодифом(Г), карбамазепином (К)	Образец: сыворотка крови человека и морских свинок; q=5 — 10 мкл	УФ-детектор λ=228 нм; ЛД=5—120 мкл/мл; ПД=0,1 мкг/мл	Сорбент—Силасорб S_i 600(5 мкм) (62x2 мм); ПФ—гексан—хлороформ—изопропанол (70 : 22 : 8); λ=228 нм; F=0,2мл/мин; время удерживания ($t_{уд.мин}$): Ф=1,3, Б=1,08, Г=2,8, К=4,75	К 0,2 мл сыворотки крови добавляется 0,2 мл раствора внутреннего стандарта ($C_{вн.ст.}$=20 мкг/мл), 0,3 мл 0,25 н HCl, 2 мл хлороформа. После перемешивания и центрифугирования органический слой сливали, выпаривали досуха. Сухой остаток растворялся в 20 мкл элюента, и 5—7 мкл этого раствора вводилось в хроматограф. Для оценки степени извлечения в 0,2 мл сыворотки готовились растворы каждого анализируемого вещества с концентрацией 5, 10, 20 мкг/мл (n=10 — каждого). Эквивалентные растворы этих веществ с теми же концентрациями, но с добавкой вн. стандарта готовились в растворе хлороформа. Степень извлечения для Ф,Б,Г,К составляла: 99±2, 98±3, 90±3, 97±3%	Количественная оценка на основе калибровочных кривых — в координатах $h_i/h_{BC} - C_i/C_{BC}$. В бланковой сыворотке готовились растворы каждого из анализируемых веществ в диапазоне 2 — 120 мкг/мл. Анализ проводился после пробоподготовки	ВС—феназепам (раствор в хлороформе с концентрацией 20мкг/мл)	(7)

1	2	3	4	5	6	7	8
Бутобарбитал (Б), гексабарбитал, амобарбитал, секобарбитал (С)	Образец: моча; q=25 мкл	УФ-детектор, 2 насоса для подачи ПФ, λ=220 нм, ЛД=0,06 — 60 мкг/мл. Масштаб — 0,01 е.о.п. $ПД_Б$=1 нг, $ПД_С$=2 нг	Предколонка сополимер-стирол—дивинилбензола 10 мкм (2x4,6 мм). $ПФ_I$ — 0,05М водный раствор ацетатного буфера. II предколонка Аминекс-28 (11 мкм) (5x3,0 мм). $ПФ_{II}$ — метанол-аммиачный буфер $4 \cdot 10^{-3}$ М (50 : 50). Аналит. колонка—Хромосфер C_{18} (5 мкм) (100x3 мм)	Моча после фильтрования через фильтр (1 — 2 мкм) вводится непосредственно в ЖХ-систему. Барбитураты выделяются из мочи селективным пробоотборником на потоке, использующем предколоночную технологию. На I предколонке происходит сорбция барбитуратов и других органических составляющих мочи. Неорганические примеси из мочи легко удаляются. Барбитураты с I предколонки в растворе ацетатного буфера $2 \cdot 10^{-3}$ М попадают на II подколонку. После их нейтрализации и десорбции барбитураты в потоке метанола — 0,1М ацетатный буфер (50:50) попадают на аналитическую колонку. Степень извлечения оценивалась по сравнению с растворами барбитуратов в растворе ПФ (для концентрации $С_{бутобарб.}$=2,0 мкг/мл и $С_{секобарб.}$=2,5 мкг/мл) и составляла соответственно 95 и 105%	Базовые растворы в метаноле с концентрацией 2 мг/мл. Для использования растворы разбавлялись водным 0,05 М ацетатом Na (pH=5,0). Контрольные растворы секобарбитала и бутобарбитала в моче готовились в диапазоне концентраций 0,06 — 60 мкг/мл. Сходимость результатов анализа секобарбитала и бутобарбитала (n=11) для концентраций С=2 мкг/мл — 3,5 и 2,5%. Коэффициент корреляции — 0,9999		

1	2	3	4	5	6	7	8
Фенобарбитал (Ф)	*Образец: моча;*	*УФ-детектор*	*Сорбент— Супелкосил*	Прямой ввод мочи, предварительно профильтро-	Для концентрации фенобарбитала в моче —		(9)

1	2	3	4	5	6	7	8
Фенобарбитал(Ф) совместно с ацетаминофеном, карбамазепином, фенацетином и др.	Образец: моча; q=20мкл	УФ-детектор λ=254 нм; $ПД_ф$=2 нг	Сорбент—Супелкосил LC — CN (5 мкм) (150x4,6 мм). ПФ—додецилсульфат натрия (0,05 М водный р-р) с фосфатным буфером pH=7,0; F=1,0мл/мин. Предколонка—силикагель (25—40 мкм) (125x4,6 мм)	Прямой ввод мочи, предварительно профильтрованной через мембранный фильтр (0,45 мкм)	Для концентрации фенобарбитала в моче — 28 мкг/мл, сходимость анализа (n=5) составляет 7%		(9)

Таблица 54. **ВЭЖХ-анализ фенилалкиламинов**

Вещество	Вид и объем вводимой пробы, мкл(q)	Детектор, предел детектирования (ПД), линейный диапазон (ЛД), шкала	Условия анализа (сорбент, подвижная фаза (ПФ), размер колонки, скорость потока (F), длина волны (λ))	Способ подготовки пробы (экстракция, осаждение, депротеинирование, центрифугирование, прямой ввод пробы)	Способ обработки результатов (внутренний стандарт (ВС); абсолютная градуировка, метод нормализации, количество измерений, погрешность)	Используемый стандарт	Ссылка на основную литературу
1	2	3	4	5	6	7	8
Фениламин (ФЭА), фенилэтаноламин (ФЭОН), тирамин (ТМ), октапамин (ОП)	Образец: плазма крови человека; q=50 мкл	Флюориметрический детектор. ПД=0,2 Моль; ЛД=2—80 Моль/мл. Дериватизация с флюорескамином	Сорбент: ODS-120T (250x4,5 мм)—5 мкм; ПФ: 0,05 М цитратный буфер (pH 2,5)—метанол-этилацетат (42:40:18); F=0,8 мл/мин; Еем=475 нм; Еех=390 нм	Пробоподготовка: к 2 мл плазмы крови добавляется 40 пМоль ВС (бензиламин). После депротеинирования с 2 мл 2,5% перхлората добавляется 2 М NaOH до получения pH=6,5. Смесь центрифугируется при 3000 g, и верхний слой переносится на колонку с Амберлитом CG=50(9,5x0,4см), предварительно промытую 0,2 М натрийфосфатным буфером (pH=6,5). Дериватизация: элюент из колонки с Амберлитом упаривается до объема 1 мл в токе N_2 при 38°С, и к нему добавляется 0,6 мл флюорескамина в ацетоне (3 мг на 100 мг). После встряхивания в течение 1 мин смесь упаривается до 1 мл в токе азота при 38°С, а затем к остатку добавляется: 50 мкл натрийацетатного буфера (pH=6,51) и 3 мл этилацетата. После упа-	Определялось содержание фенилалкиламинов в плазме добровольцев (n=16) и пациентов клиники (n=6). Содержание в плазме добровольцев (пМоль/мл): ФЭА — 0,33±0,23 ФЭОН — 0,70±0,53 ТМ — 0,49±0,37 ОП — 0,75±0,50. Содержание в плазме пациентов (пМоль/мл): ФЭА — 0,52±0,50 ФЭОН — 4,58±3,02 ТМ — 1,78±0,88 ОП — 2,64±2,46	ВС—Бензиламин (40пМоль)	(2)

Продолжение табл. 54

1	2	3	4	5	6	7	8

1	2	3	4	5	6	7	8
				ривания сухой остаток растворяется в 40 мкл воды и 40 мкл ПФ; 50 мкл вводится в ХК. Степень извлечения всех анализируемых веществ и ВС — 62—83% (n=4); коэффициент вариации —3,9—8,7%			
Псевдоэфедрин (ПЭ)	Образец: плазма крови и моча человека; q=100мкл	УФ-детектор, чувствительность— 0,02 е.а. (единиц абсорбции); $ПД_{в\ плазме}$= 26 нг/мл; $ПД_{в\ моче}$= 2,5 мкг/мл	Сорбент— Лихросорб-100 (250x4 мм); 5 мкм. ПФ: 20 г метанола, 800 г воды, 160 г ацетонитрила, 1 г пентан сульфоната и 1 г гептан сульфоната Na; F=1,5мл/мин; λ=205нм; $t_{удПЭ}$ = 4,1 мин; $t_{удВС}$ = 5,9 мин	Подготовка плазмы: к 0,25 мл плазмы добавляется 100 мкл ВС (ацетобутанола); 0,25 мл смеси: 10 г NaOH и 40 г Na_2CO_3 в 1000 мл H_2O, 6 мл смеси н. гексан и диэтиловый эфир (1:1). Смесь перемешивается 30 мин, центрифугируется 10 мин при 2000 об/мин. Органическая фаза декантируется в другую пробирку, содержащую 150 мкл 0,05 М H_2SO_4. Перемешивается 10 мин и центрифугируется при 2000 об/мин. Органическая фаза удаляется, и q=100 мкл вводится в ХК. Подготовка мочи: а) с использованием твердожидкостной экстракции. К 1 мл мочи добавляется 75 мкл (С=1 мг/мл) ВС (ацетобутанола), 1 мл 0,14М NaOH.	Контрольные растворы ПЭ в плазме с концентрациями: 500, 250, 100, 50 и 25 нг/мл. Готовятся из рабочего раствора ПЭ—1000 нг/мл в плазме, в свою очередь получаемого из исходного: 1 мг/мл ПЭ в воде разбавляется плазмой до концентрации в плазме 1000 нг/мл. По калибровочному графику для контрольных растворов в плазме (анализу предшествовала пробоподготовка) определялись ур-ния регрессии y=0,00015X±0,008 и коэффициент корреляции r=0,9996. Приводятся результаты анализа ПЭ в крови добровольца после приема 100 мг ПЭ через 24 ч (концентрация составляет 26 нг/мл) и через 2 ч (концентрация ПЭ составляет 340 нг/мл)	ВС—ацетобутанол (10 мг/мл в воде)	(3)

1	2	3	4	5	6	7	8
				Смесь переносится в экстракционную колонку C_{18}, предварительно дважды промытую раствором 20%-ного метанола в воде. Анализируемые вещества элюировались 500 мкл метанола и перемешивались с 1,5 мл 0,05 М H_2SO_4, q=150 мкл вводится в ХК; б) с использованием предколонки «Лихросорб» CN — 40 мкм (50x4 мм). Оценивалась степень извлечения по сопоставлению площади пика анализируемого вещества после экстракции и площади пика этого вещества в растворе ПФ. Степень извлечения ПЭ из плазмы — 95%, из мочи — 98 — 100%			
Псевдоэфедрин (ПЭ)	Образец: плазма крови и моча человека; q=20 — 40 мкл	УФ-детектор, чувствительность— 0,02 е.а. (единиц абсорбции); ПД = 10 нг/мл; ЛД=10— 500 нг/мл	Сорбент—μ — Бондапак (300x4,6 мм); 10 мкм	Подготовка плазмы с использованием твердо-жидкостной экстракции. К 1 мл плазмы добавляется 1 мл воды, 50 мкл ВС (С=10 мкг/мл) и 30 мкл 25%-ного аммиака. Смесь перемешивается и пропускается через экстракционную колонку в течение 2—3 мин. Затем	Исходный раствор ПЭ готовится с концентрацией 1 мг/мл в 0:03 М HCl (pH=3). Рабочие растворы получаются путем разбавления исходного водой до концентраций 10 и 0,1 мкг/мл. Для приготовления стандартных растворов используются 1 мл сыворотки и различ-	ВС—N—(метиламинометил)—бензиловый спирт, С=10 мкг/мл (1 мг ВС растворяется в	(4)

1	2	3	4	5	6	7	8

течение 2—3 мин. Затем 1 мл сыворотки и различ- ется в

Продолжение табл. 54

1	2	3	4	5	6	7	8
				через эту колонку пропускается 300 мкл 0,1 М метанола в HCl. Элюат упаривается досуха при 40°С в токе N_2. Сухой остаток растворяется в 100 мкл воды; 20—40мкл вводится в ХК. Подготовка мочи: моча разбавляется водой 1:10 (остальное аналогично плазме). Коэффициент извлечения для ПЭ— 85—88% (n=5). Рассчитывается по сопоставлению сигнала ПЭ после пробоподготовки и сигнала ПЭ из водного раствора	ные количества рабочих растворов. Стандартные растворы — 10—500 нг/мл ПЭ. Определялась воспроизводимость для смесей ПЭ с концентрациями 20, 100 и 500 нг/мл. Коэффициент вариации — 1,8—8%. Концентрация ПЭ в моче добровольца после приема 120 мг ПЭ через 8 ч — 174 нг/мл, в крови через 24 ч — 35 нг/мл	1 мл 0,03 М HCl до pH=3, а затем разбавляется водой 1:100). Этот раствор устойчив в течение 5 дней в холодильнике	
Эфедрин и эфедрон	Образец: моча человека; q=2 — 5 мкл	УФ-детектор, чувствительность— 0,8x1,6 е.о.п. ПД =60— 80 нг	Сорбент: 1) Партисил (260x0,8 мм); 2) Силасорб 600 (50x3,5 мм); ПФ—гексан-ацетон-этилацетат (40:8:2); F=50, 100 мкл/мин; λ=330 нм продуктов дериватизации	Пробоподготовка для дериватизации: к 5 мл мочи добавляется 20 мкл ВС, 10% NH_4OH до pH=9—10 и 5 мл бензола. После перемешивания и центрифугирования бензольная фаза декантируется и упаривается до 0,5 мл. К остатку добавляется 1—2 капли бензола и 0,5 мл аммиачного реактива Ni. Время дериватизации — 30 мин. Органическая фаза сливается, упаривается досуха в токе воздуха комнатной тем-	Калибровочные растворы эфедрина и эфедрона готовятся в моче (с последующей пробоподготовкой) в диапазоне концентраций 1—20 мкг. Градуировочная зависимость в координатах $S_i / S_{ст} - Q$ мкг. Определялось содержимое эфедрина и эфедрона в моче добровольца через различные промежутки времени после приема 300 мг эфедрона	ВС—анаприлин (20 мкг)	(5)

1	2	3	4	5	6	7	8
				пературы. Сухой остаток растворяется в ПФ и 2—5 мкл вводится в ХК. Степень извлечения эфедрина и эфедрона зависит от pH: при ph=9—48,8% (n=5), при pH=11 — 71% (n=5)			
Бензиламин, фенилэтиламин, фенилпропиламин, фенилбутиламин, метамфетамин (M), эфедрин амфетамин (A)	Образец: моча человека; q=20 мкл	Хемилюминисцентный (X) и флюориметрический (Ф) детекторы с использованием различных агентов дериватизации: а) денсилхлорид (D_nS — Cl); б) 4-фтор-7-нитробензоксидиазол (НБД-Ф); в) нафталин-2,3-дикарбальдегид. $ПД_{мА}$ а) D_nS —Cl $ПД_{хемил}$= $4 \cdot 10^{-15}$ Моль; $ПД_{флюор}$= $50 \cdot 10^{-5}$ Моль;	Сорбент: Интерсил ОД-2 (250x4,6 мм); ПФ: ацетонитрил—вода (7:3) с добавкой имидазола ($C=10^{-3}$ M); F=1 мл/мин; $Б_{ex}$=343 нм; E_{em}=540 нм; V_R=19 мин. Фон мочи выписывается в течение 15 мин	Пробоподготовка мочи: метамфетамин ($C=10^{-7}$ M, готовился из рабочего раствора с концентрацией 10^{-4} M) растворяется в моче человека. К 2 мл раствора мочи с метамфетамином 10^{-7} M добавляется 2 мл NaOH (2% в воде), 2 мл диэтилового эфира. После перемешивания в течение 5 мин, центрифугирования при 1000g в течение 10 мин эфирная фаза отделяется и используется для дериватизации. 1) Дериватизация с D_nS—Cl. К 0,1 мл эфирного экстракта мочи добавляется 0,4 мл карбонатного буфера (конц. в воде 10^{-2} M; pH=9,2 с NaOH); 0,5 мл D_nS — Cl раствора (10^{-3} M в ацетоне). После перемешивания смесь упаривается досуха при 45° на водяной бане.			(6)

1	2	3	4	5	6	7	8
		б) НБД —Ф $ПД_{хемил}$= $20000 \cdot 10^{-15}$		2) Дериватизация с НБД—Ф. К 0,1 мл эфирного экс-			

1	2	3	4	5	6	7	8
		б) НБД —Ф $ПД_{хемил}$= $20000 \cdot 10^{-15}$ Моль; $ПД_{флюор}$= $30000 \cdot 10^{-15}$ Моль		2) Дериватизация с НБД—Ф. К 0,1 мл эфирного экстракта мочи добавляется 0,4 мл боратного буфера (борная кислота с концентрацией 10^{-1} М в воде, pH=8 с NaOH) и 0,5 мл НБД—Ф ($8 \cdot 10^{-2}$ М в этаноле). После перемешивания смесь упаривается досуха при 60°С. Степень извлечения метамфетамина из мочи с концентрацией $5 \cdot 10^{-7}$ М — 99,3±0,7%			
а) амфетамин (А) и его метаболиты: (П—гидроксиамфетамин—ГА) норэфедрин—Н П-гидроксинорэфедрин—ГН	Образец: плазма, моча человека; q=20 мкл	УФ-детектор; ЛД=20—250 мкг/мл; $ПД_{в\ моче}$= 250 нг/мл	Сорбент: Партисил ODS (250x5 мм); 10 мкм. ПФ: 0,01% H_2SO_4 (pH=2) — метанол (50:50) с добавкой 10^{-3}М Na-додецилсульфата. Время анализа — 5 мин; λ=254 нм; F=1 мл/мин; α*=1,3; 2,1; 1,6	К 20 мл мочи (10 мл плазмы) добавляется 5 н NaOH до pH=11,4; 5 мл этого раствора пропускается через колонку с Амберлитовой смолой (1,5 г), предварительно промытой 10 мл воды. Анализируемые вещества вымывались 40 мл воды (для мочи) и 20 мл (для плазмы) смесью хлороформ-изопропанол (3:1). К органическому элюату добавляется 100 мкл раствора HCl в этаноле (6 н). Смесь упаривается досуха на роторном испарителе. Остаток растворяют в ПФ и q=20 мкл вводят в ХК	Способ обработки результатов — абсолютная градуировка. Определяется уравнение регрессии и коэффициент корреляции r=0,999. Определена концентрация амфетамина в моче пациента — 8,5 мкг/мл		(7)

1	2	3	4	5	6	7	8
б) метамфетамин (М), амфетамин (А)		УФ-детектор	Сорбент: Лихросфер 100 (10 мкм) (150x5 мм) ПФ—0,1 М нафтаин-2-сульфонат в нитратном буфере (pH=3); λ=274 нм; F=1 мл/мин;	Сухой остаток мочи (плазмы) (см. а) растворяется водой и вводится в ХК			
в) норэфедрин, гидроксиамфетамин, амфетамин, бензиламин (ВС)	q=50 мкл	УФ-детектор, флюориметр. Дериватизация с ортофталевым альдегидом (ОФА). $ПД_{в\ моче}$=60 нг/мл. $ПД_{в\ плазме}$=600 нг/мл. Дериваты устойчивы в течение 60 мин	Сорбент: Партисил ODS (250x5 мм), 10 мкм. ПФ—73% метанол. F=1,8 мл/мин; E_{em}=455 нм; E_{ex}=345 нм	Сухой остаток, полученный из мочи, плазмы, при пробоподготовке растворяли в 1 мл этанола и добавляли 1 мл реагента дериватизации — ортофталевого альдегида, приготовленного следующим образом: к 200 мг ортофталевого альдегида добавляли 2 мл метанола; 0,4 мл неразбавленного меркаптоэтанола, боратный буфер (1 г борной кислоты в 38 мл воды) до pH=10,4 с 4 М KOH. Реагент устойчив 5 дней. Смесь фильтруется и 50 мкл фильтрата вводится в ХК		ВС—Бензиламин—7,5 мкг/мл	
г) метамфетамин, амфетамин, норэфедрин,	q=50 мкл	УФ-детектор, флюориметр. Дериватизация с нафтахиноном-4-	Сорбент: Партисил 5 (150x5 мм). ПФ—хлороформ-этилаце-	Сухой остаток, полученный из мочи, плазмы, при пробоподготовке растворился в 1 мл 8% Na_2CO_3. К смеси добав-	Градуировочная зависимость в диапазоне 0,5 — 5 мкг/мл. Коэффициент корреляции — 0,996	ВС—фенилэтиламин (5 мкг/мл)	

амфетамин, норэфедрин,	Дериватизация с нафтахиноном-4-	(150x5 мм). ПФ—хлороформ-этилаце-	при пробоподготовке растворился в 1 мл 8% Na_2CO_3. К смеси добав-	0,5 — 5 мкг/мл. Коэффициент корреляции — 0,996			ламин (5 мкг/мл)

Продолжение табл. 54

1	2	3	4	5	6	7	8
гидроксиамфетамин, фенилэтиламин (ВС)		сульфонатом $ЛД_{в\ моче}$= 0,5 — 5 мкг/мл	тат-гексан-этанол (25:35:50:1). F=2,5мл/мин; λ=248 нм. Флюориметр: E_{ex}=465нм; E_{em}=515 нм. Время анализа — 4 мин	ляется 1 мл реагента дериватизации — нафтахинона-4-сульфоната Na. После нагревания при 70° в течение 20 мин водный раствор экстрагируется хлороформом. Органическая фаза используется для хроматографического анализа. Производные амфетамина с нафтахинон-4-сульфонатом Na устойчивы не менее 4 ч			

α *— селективность

Таблица 55. ВЭЖХ-анализ производных 1,4-бензодиазепин

Анализируемый объект	Вид и объем пробы	Детектор, предел детектирования (ПД), линейный диапазон (ЛД), шкала	Условия анализа: сорбент, подвижная фаза (ПФ), размер колонки, скорость потока (F), скорость ленты (V)	Способ подготовки пробы (экстракция, осаждение, депротеирование, центрифугирование, прямой ввод пробы)	Способ обработки результатов (внутренний стандарт (ВС), абсолютная градуировка, количество измерений, сходимость, погрешность)	Используемый стандарт	Ссылка на основную литературу
1	2	3	4	5	6	7	8
Хлордиазепоксид (Х), норхлордиазепоксид (НХ), оксазепам (О), диазепам (Д) и флузепам (ВС)	Сыворотка крови, V=50 мкл	УФ-детектор. ЛД=50 — 2000 нг/мл; шкала—0,01; 0,02 единицы абсорбции (е.а.)	Сорбент: предколонка (30x2,1мм) C_8 (10 мкм), аналитическая колонка (100x2,1 мм) C_8 (3 мкм); ПФ—700 мл; KH_2PO_4 (0,01 М)+ 300 мл ацетонитрила+100 мкл диметиламина; F=0,3 мл/мин; λ=242 нм	1 мл контрольного раствора бланковой сыворотки или сыворотки пациента (совместно с 200 мкл раствора ВС с концентрацией 5 мкг/мл) пропускается через колонку с твердофазным сорбентом (C_{18}, 40 мкм), предварительно кондиционированную. Гидрофобные и гидрофильные примеси сыворотки удаляются 3 мл смеси: дистиллированная вода—метанол—ацетонитрил (2:3:3), после чего колонка вакуумируется в течение 2 мин при 250 мм рт.ст., а накопленные бензодиазепины извлекаются 400 мкл вышеуказанной смеси. Элюат разбавляется 1 мл дистиллированной воды, перемешивается; 50 мкл вводится в хроматограф	Базовые растворы бензодиазепинов в метаноле—1 мг/мл. Рабочие растворы готовятся из базовых в бланковой сыворотке в диапазоне концентраций 0,05—2 мкг/мл. Контрольные растворы анализируемых компонентов в бланковой сыворотке с концентрациями: а) по 500 нг/мл; б) по 100 нг/мл (с последующей пробоподготовкой). Степень извлечения оценивалась по сопоставлению результатов анализа водных растворов указанных веществ и экстрактов и составляла для двух значений концентраций — 50 и 500 нг/мл — 97 и 107%. Воспроизводимость анализа <5% для n=10. Уравнение регрессии строилось в координатах $h_i / h_{BC} - C_i / C_{BC}$. Коэффициент корреляции — 0,999	ВС—флузепам (С=1000 нг/мл) в смеси вода—метанол—ацетонитрил (2:3:3)	(7)

1	2	3	4	5	6	7	8
Хлордиазепоксид(Х) и его метаболиты: демоксепам (Д), N-дезметилхлордиазепоксид (ДХ), N-дезметилдиазепам (ДД) и нитразепам (ВС)	Плазма крови; q=20, 50; 100 мкл	УФ-детектор. Шкала — 0,01 е.а. ЛД=0,05—30 мкг/мл; ЛД=0,03—30 мкг/мл	Сорбент: аналитическая колонка. Лихросорб RP_{18} (10 мкм) (250x4 мм). ПФ—ацетонитрил—0,1 М карбонат аммония (35:65); F=2мл/мин; λ=260 нм. Время удерживания (мин): Д—4,0; ДХ—5,0; ВС—6,3; Х—7,7; ДД—11	К 1—2 мл плазмы, содержащей Х, Д, ДХ и ДД, добавляется 0,1 н HCl до pH=9(≈ 0,275 мл) и 5 мл дистиллированной воды. После встряхивания добавляется по 5 мл диэтилового эфира и дистиллированной воды. Смесь центрифугируется (3 мин, 2500g), эфирный слой удаляется, и проводится повторная экстракция водной фазы. Эфирные экстракты объединяются, упариваются при 40°С в токе воздуха. Остаток растворяется в 100 мкл подвижной фазы, содержащей 10 мкг ВС, и добавляют 100 мкл гексана. После встряхивания и центрифугирования гексан вместе с содержащимися липидами удаляется шприцем, а 20 мкл оставшегося экстракта вводятся в хроматограф	Градуировочные графики для всех компонентов (в диапазоне 0,03—30 мкг/мл) строились в координатах S_i / $S_{ВС}$ – C_i / $C_{ВС}$ По графикам определялось содержание Х, ДХ, ДД в плазме добровольца, принявшего 30 мг Х. Степень извлечения оценивалась для концентраций анализируемых веществ 0,1—1,2 мкг/мл и составляла 76—103% с погрешностью 1—5% для n=5	ВС—нитразепам (10 мкг)	(8)
Диазепам (Д) и его метаболиты: оксазепам(О), темазепам (Т)	Сыворотка крови	УФ-детектор; ЛД=4—1000 нг/мл; ПД=4 нг/мл	Сорбент: предколонка (15x3,2 мм) ODS(5 мкм); аналитическая колонка (250x1 мм)	Прямой ввод сыворотки, содержащей известное количество Д,О, Т (0,5 мл), предварительно депротеинизированной за счет ультрафильтрации, в предколонку. Колонка	Абсолютная градуировка по каждому компоненту в диапазоне концентраций 4—1000 нг/мл. Уравнение регрессии строилось в координатах h_i – C_i		(9)

1	2	3	4	5	6	7	8
			Адсорбосфер ODS(5 мкм). Расход ПФ— для предколонки — вода; F=1мл/мин. Расход ПФ для аналитической колонки ацетонитрил — вода (35:65;40:60; 50:50). F=60мкл/мин; λ=242 нм; коэффициенты емкости (K^1): О — 4,3 Т — 4,7 Н — 5,8 Д — 7,0	промывалась в течение 5 мин водой, после чего в обратном направлении— смесью ацетонитрила и воды (65:35); накопленные Д,О,Т переносились в аналитическую колонку	с коэффициентом корреляции r=0,998. Степень извлечения Д во всех диапазонах определяемых концентраций — 96,6%. Погрешность для определения СД=160 нг/мл — 5% (n=8)		
Диазепам (Д), клоназепам (К), нордиазепам (Н), 4,5-дигидродиазепам (ВС)	Плазма крови; q=20 мкл	УФ-детектор; $ПД_д$=5нг/мл; $ПД_{кн}$=10 нг/мл	Сорбент: Партисил—5, 5 мкм (250x4,5x5мм); ПФ—циклогексан—хлороформ—ацетонитрил—метанол (29:55,5:15:0,5); F=1 мл/мин; (P=6,67 МПа); λ=254 нм	К 1 мл плазмы, содержащей известное количество Д, К, Н, добавляется 0,5 мл ВС (С=1,8 мкг/мл), 0,5 мл глицинового буфера (2 моль/л, pH=10,5) и 5 мл смеси бензол-дихлорметан (9:1). После встряхивания (10 мин) и центрифугирования органический слой сливали, упаривали досуха при 55°С в токе азота; остаток растворяли	Базовые растворы в метаноле с концентрациями: Д—0,3 мг/мл, К—0,1 мг/мл, Н—0,9 мг/мл. Рабочие растворы готовились при разбавлении метанолом базовых, концентрация (мкг/мл): Д—4,5; К—1,5; Н—13,5. Контрольные растворы в плазме: 50 — 100 мкл рабочего раствора досуха упаривали в 1 мл плазмы (с последующей пробоподготовкой). Степень из-	4,5-дигидродиазепам гидрохлорид: а) С ≠ 0,1 мг/мл в смеси: метанол—1 М HCl (9:1); б) С=1,8 мкг/мл в смеси: метанол-	(10)

1	2	3	4	5	6	7	8
				в 70 мкл ПФ и 20 мкл вводили в хроматограф		аскорби-	

1	2	3	4	5	6	7	8
				в 70 мкл ПФ и 20 мкл вводили в хроматограф	готовкой). Степень извлечения оценивалась для концентраций в плазме: Д—138 нг/мл, К—42,4 нг/мл, Н—268 нг/мл и составляла соответственно 92,9±3,3%; 89,6±5,2% и 93,6±3,8%. Сходимость определения по всем компонентам не превышала 3%. Воспроизводимость в течение 3-х дней по всем компонентам не превышала 6%	аскорбиновая кислота (9:1)	
Диазепам (Д) и его метаболиты: дезметилдиазепам (ДД) и оксазепам (О), празепам (ВС)	Сыворотка крови; q=10 мкл	УФ-детектор; F=1 мл/мин	Сорбент: Сферисорб ODS—5 мкм (250x4,6мм); ПФ: метанол—вода—уксусная кислота (56:42:2)	К 1 мл холостой сыворотки, содержащей известные количества Д, ДД и О, добавляется: насыщенный раствор Na_3PO_4 до pH=13, 10 мл хлороформа, 100 нг ВС. После встряхивания в течение 15 минут и центрифугирования (5 мин) водный слой удаляли, а хлороформенный — упаривали досуха при 35°С в токе азота. Остаток растворяли в 100 мкл метанола и 10 мкл вводили в хроматограф	Градуировочные графики Д, ДД и О с концентрациями (100, 200, 400 и 600 нг/мл в метаноле и в бланковой сыворотке (с последующей экстракцией) строились в координатах $S_i / S_{BC} - C_i / C_{BC}$ Степень извлечения для всех компонентов составила 92—100% с погрешностью 5% (n=7). По градуировочным графикам определено содержание Д, ДД и О в сыворотке пациента	ВС—празепам, c=100 нг/мл	(11)
Хлордиазепоксид (Х), диазепам(Д),	Трупная кровь; q=10 мкл	УФ-детектор, электрохимический детектор, амперо-	Сорбент: Гиперсил ODS—3 мкм (150x4,5 мм),	К 100 мкл трупной крови с известным содержанием бензодиазепинов (после центрифугирования) до-	Степень извлечения для всех анализируемых компонентов составляла 75 — 95% (n=9).	ВС—6-нитрохинолин	(12, 13)

1	2	3	4	5	6	7	8
лоразепам (Л), нитразепам (Н) и их метаболиты, 6-нитрохинолин (ВС)		метрический детектор; $ПД_х$= 1,5нг/мл; $ПД_д$= 1,8нг/мл; $ПД_о$= 3,1нг/мл; $ПД_н$= 0,32нг/мл; ЛД=4—2140нг/мл	$t_{кол}$=40°С, ПФ:метанол-1-пропанол-водный фосфат (100:7,8:80), pH=6; водный фосфат — 0,0174 М KH_2PO_4 и 0,0026 М Na_2HPO_4; F=1 мл/мин; λ=240 нм; электрохимический детектор = при 1,2 v от Ag(AgCl)	бавляется: 250 мкл 0,2% октилсульфата Na в водном 0,1 М Na_2HPO_4 (для протеинирования) и ВС. Смесь центрифугируется и подвергается твердофазной экстракции на сорбенте Порапак-Т (5 мг, 60x1 мм). Бензодиазепины вымывались из этой колонки смесью вода—ацетонитрил (7:4); 10 мкл элюата вводили в хроматограф	Коэффициент корреляции для Д—r=0,996; для Н—r=0,999		
19 бензодиазепинов (в том числе оксазепам, нитразепам, хлордиазепоксид, медазепам)	Моча, кровь и др. биолог. жидкости	Фотодиодный сканирующий спектрофотометрический детектор; ПД=3 нг/мл (моча); ПД=5 нг/мл (кровь); ПД до 20 мг/л	Сорбент: предколонка (20x2 мм) C_2; аналитическая колонка (300x4,6 мм). μ-Бондапак (5 мкм). ПФ-градиент: ацетонитрил (А)-фосфатный буфер (Ф) (pH=5,4). Программа: А Ф t, мин 38 62 0 38 62 15	К 50 мкл биологической жидкости добавляется 500 мкл ВС и 300 мкл смеси: ацетонитрил — 0,1 М KH_2PO_4 (10:90), pH=9. Смесь пропускают через предколонку, которая потом промывается 1 мл смеси: ацетонитрил — 0,1 М KH_2PO_4	Градуировочные графики для всех компонентов строились в координатах $h_i / h_{ВС} - C_i / C_{ВС}$. Сходимость анализа: для диазепама — 3,8%; для оксазепама — 6,5% при концентрации 1 мг/л. Воспроизводимость (день ото дня): для диазепама—5%; для оксазепама—14,2%; степень извлечения 92—104% и от концентрации не зависит	ВС-празепам	(14)

1	2	3	4	5	6	7	8
			70 30 22 70 30 40 38 62 45 F=0,7 мл/мин Время анализа—40 мин				
Нитразепам (Н)	Плазма крови крыс; q=25 мкл	УФ-детектор; шкала — 0,005 е.а. ЛД=200нг/мл; ПД=10нг/мл;	Сорбент: Зорбакс ОДS (5 мкм) (150x4,6 мм) ПФ—ацетонитрил-фосфатный буфер (2:3). Буфер: 0,6 М KH_2PO_4 и 14,7 М H_3PO_4 (до pH=3); F=1мл/мин; λ=221 нм; $t_{уд}$=6,2 мин	К 200 мкл плазмы добавляется 80 мкл раствора ВС (1 мкг/мл триазалона в ацетонитриле), 1 мл 0,01 М NaOH и 5 мл диэтилового эфира. Смесь встряхивается 15 мин, центрифугируется при 1500g (10 мин). Органический слой удаляется и упаривается досуха в токе азота при 40°С. Сухой остаток растворяется в 70 мкл ПФ, и 25 мкл вводится в хроматограф	В плазму добавлялось 10—200 нг/мл Н, проводилась совместная с ВС пробоподготовка. Градуировочные графики в координатах C_i / $C_{ВС}$ – h_i / $h_{ВС}$ обрабатывались методом наименьших квадратов. Определено уравнение регрессии, коэффициент корреляции (n=21) — 0,999. Сходимость результатов анализа (n=7) не превышала 3%. Воспроизводимость в течение 5 дней не превышала 5%. Степень извлечения Н для С =20 нг/мл и 60 нг/мл составляет 98% при погрешности <5% (n=10)	ВС—триазалон (С=1 мкг/мл) в ацетонитриле	(15)
Диазепам (Д) и его метаболиты: оксазепам (О), темазепам (Т), нордиазепам (НД),	Сыворотка крови, моча; q=10 мкл	УФ-детектор; шкала —1,0; 0,25; 0,125 е.а.; ЛД=2 — 200 мкг/мл; ПД=2 мкг/мл	Сорбент: предколонка (15x3,2мм)—ОДS (5 мкм); аналитическая колонка (250x1 мм). Адсорбосфер ОДS (5 мкм)	Прямой ввод пробы. 200 мкл сыворотки или мочи вводится на предколонку, которая промывается ПФ (1), удаляя экзогенные и эндогенные составляющие биопробы. Накопленные на предколонке примеси диазепама и его	Строились градуировочные графики по каждому компоненту в диапазоне 2—200 мкг/мл (абсолютная калибровка). Оценивались коэффициенты регрессии и корреляции (r=0,988). Степень извлечения этого метода		(16)

1	2	3	4	5	6	7	8
фенобарбитал (Ф)			ПФ (1) для предколонки—0,01 М додецилсульфат Na; ПФ (2) для аналит. колонки—ацетонитрил—0,025 М фосфатный буфер (15:85); $\lambda_{ф}$ = 208 нм $\lambda_{д.о.т}$ = 248нм $F_{пф(1)}$=1 мл/мин $F_{пф(2)}$=45 мкл/мин	метаболиты в обратном направлении вымываются ПФ (2) на аналитическую колонку. Предколонка позволяет ввод 50—100 мл мочи или сыворотки	оценивалась по сопоставлению площади пика известного количества вещества, содержащегося в сыворотке, со стандартными результатами. Она составляла 102%. Сходимость метода (n=6) составляла 1,6%		

ГЛАВА16

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИООБЪЕКТАХ

В настоящее время компьютеризованный метод газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием (ГХ/МС-метод) как высокоспецифичный, чувствительный и достаточно быстрый получил широкое применение для целей клинической, судебной и токсикологической химии. Преимущество его использования для идентификации неизвестных ядов, наркотических и лекарственных веществ и их метаболитов признано повсеместно. По сравнению с прочими методами надежность идентификации существенно повышается из-за использования специфической характеристики вещества, каковой является масс-спектр, в дополнение к параметрам удерживания, получаемым в хроматографическом процессе.

Поскольку масс-спектр отражает структуру молекулы, то его детальное изучение, основанное на известных закономерностях образования ионов, позволяет сделать логический вывод о строении и формуле анализируемого соединения. Идентификация значительно облегчается использованием компьютерного поиска на основе библиотек программного обеспечения, являющихся непременной частью современных ГХ/МС/ЭВМ-систем.

В области фармацевтического, токсикологического и судебного анализа, в том числе для определения наркотических и сильнодействующих веществ, используются в основном два типа ГХ/МС/ЭВМ-систем, имеющих отличия в конструкции масс-спектрометра и в программном обеспечении. Первый, фирмы "Хьюлетт — Паккард", использует "масс-селективный детектор" (МСД), второй, фирмы "Финниган", оснащен "ионной ловушкой".

Данный материал относится к ГХ/МС/ЭВМ-системе "Хьюлетт — Паккард": газовый хроматограф HP-5890, серия II, МСД HP-5971A, станция контроля и обработки данных HP-59970C.

16.1.ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРАЛЬНОГО (ГХ/МС) АНАЛИЗА

16.1.1.Общая схема ГХ/МС-анализа

Общая схема анализа с применением ГХ/МС/ЭВМ-системы представляет собой последовательность операций:

1. Пробоподготовка.

2. Разделение на хроматографической колонке.
3. Ионизация в камере масс-спектрометра.
4. Разделение ионов по величине отношения массы к заряду.
5. Регистрация ионов фотоумножителем.
6. ЭВМ-обработка "сырых" сигналов, хранение информации.

В результате данные представляются в виде масс-спектра любой точки хроматограммы и далее могут быть подвергнуты обработке с целью получения вторичной информации о качественном и количественном составе анализируемой пробы. Основные операции:

— определение площадей хроматографических пиков (интегрирование);

— вычисление количественного соотношения компонентов (нормировка);

— построение калибровочного графика по результатам анализа стандартных растворов;

— вычисление концентрации компонента в анализируемой смеси;

— сравнение масс-спектра со стандартными спектрами библиотек и представление списка веществ для идентификации с количественной оценкой степени соответствия.

Библиотеки, используемые в ГХ/МС-системе HP-5890/5971, включают 1600 лекарственных и токсических соединений и их метаболитов и 43 000 соединений более широкого профиля.

16.1.2.Особое свойство ГХ/МС-метода — детектирование отдельных ионов (SIM)

ГХ/МС-анализ может осуществляться в двух режимах: I —сканирование, II — детектирование отдельных ионов, селективный ионный мониторинг (SIM).

В режиме сканирования детектируются все ионы в заданном интервале величин m/z в пределах от 10 до 650 абсолютных единиц массы (а.е.м.), как правило от 40 до 550 а.е.м.

В режиме селективного ионного мониторинга сканирование полного масс-спектра не производится, но регистрируются отдельные предварительно заданные ионы. ЭВМ позволяет осуществлять мониторинг 10 групп ионов по 20 ионов в каждой. Этот режим обеспечивает более высокую чувствительность, в 100 — 1000 раз выше, чем при сканировании, и применяется в количественном анализе. Как правило, для каждого анализируемого вещества задается набор из трех — пяти ионов, по наиболее интенсивному ("базовому") ведут количественные измерения, а остальные ("характеристические") используют для подтверждения правильности идентификации.

16.1.3.Хроматографическое разделение

В газовом хроматографе использована кварцевая капиллярная колонка 12м × 0,2мм с пленкой 0,33 мкм привитой стационарной фазы HP-1. Данные о других стационарных фазах, которые могут быть использованы для решения сходных задач, приведены в табл. 56.

Таблица 56. **Характеристика стационарных фаз, используемых в капиллярных колонках фирмы "Хьюлетт — Паккард"**

Фаза	Сходные фазы других фирм	Химический состав	Полярность	Применение
HP-1	OV-1 SE-30	100%-ный диметилполисилоксан	неполярная	фенолы, углеводороды, амины, пестициды
HP-101	OV-101	100%-ный диметилполисилоксан	неполярная	производные аминокислот, масла
HP-5	OV-73 SE-52 SE-54	5%-ный дифенил-, 95%-ный диметилполисилоксан	условно неполярная	метиловые эфиры жирных кислот, алкалоиды, лекарственные вещества
HP-17	OV-17	50%-ный фенил-, 50%-ный метилполисилоксан	промежуточная	стероиды, гликоли, пестициды
HP-FFAP	OV-351	полиэтиленгликоль модифицированный	полярная	кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, нитрилы, акрилаты
HP-20M	карбовакс 20M	полиэтиленгликоль	полярная	свободные кислоты, спирты, эфиры, летучие масла, гликоли, растворители

Ввод пробы может быть осуществлен в обычном варианте "с разделением потока" (split), со сбросом избытка объема пробы, например в отношении 1:40, а также в варианте "запаздывающего разделения потока" (split/splitless). Раствор в хлороформе, метаноле или гексане объемом 0,5 — 0,8 мкл вводится в "холодную" колонку (температура 50 — 75°C), где конденсируется и затем быстро испаряется при нагревании колонки, целиком оставаясь в хроматографической системе. Разделение потока газа-носителя автоматически включается через заданный интервал времени (от 0,3 до 2 мин) для очистки системы ввода от паров растворителя. При этом способе ввода вся проба целиком остается в колонке, что особенно важно при анализе низких концентраций.

16.1.4.Устройство и принцип работы МСД

На рис. 60 представлена функциональная схема ГХ/МСД/ЭВМ-системы. Анализируемое соединение из колонки хроматографа через

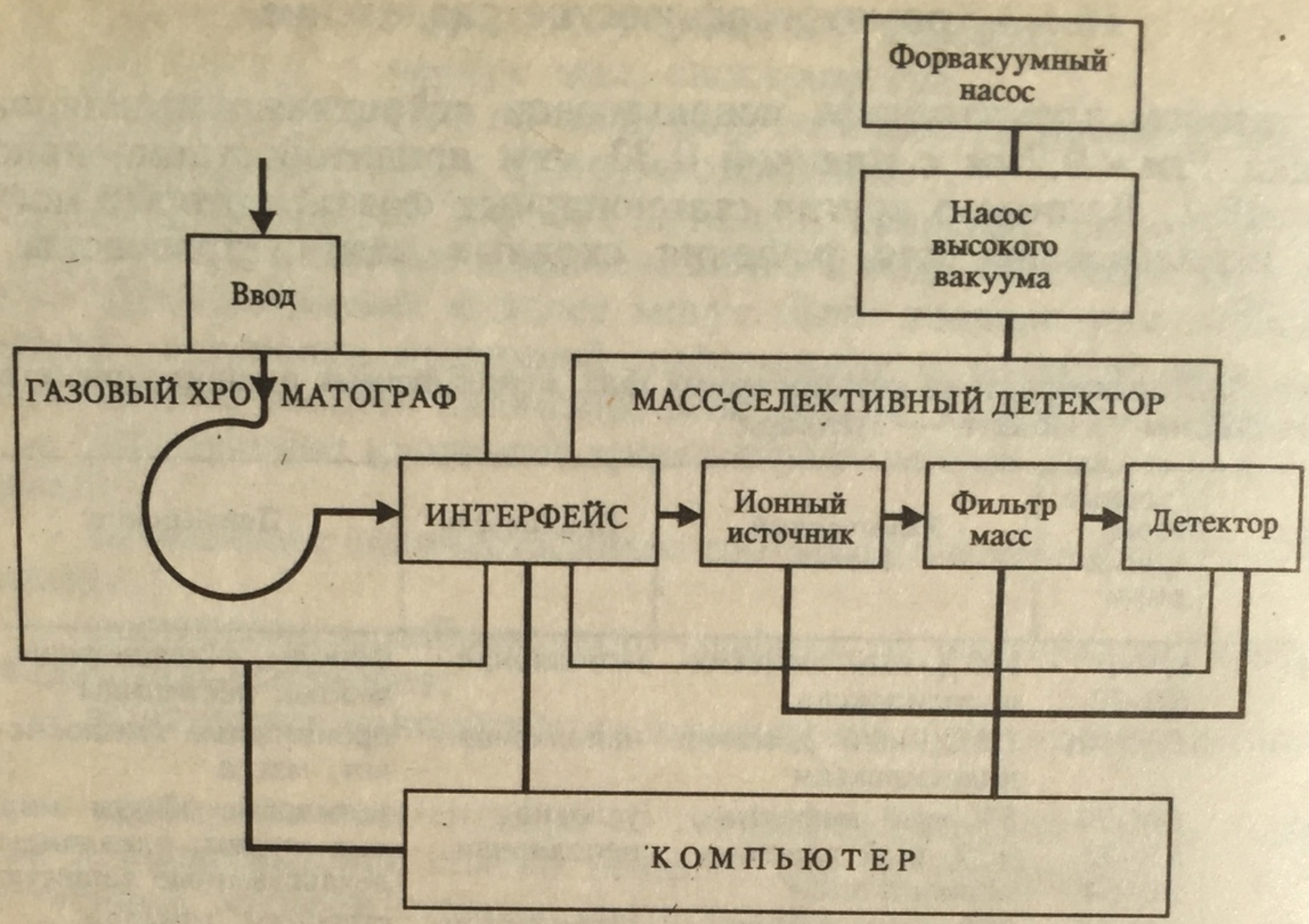


Рис. 60. **Функциональная схема ГХ/МСД/ЭВМ-системы**

соединительное устройство (интерфейс) попадает в МСД, который состоит из трех функциональных блоков, помещенных в вакуумированную камеру (10^{-5} — 10^{-6}торр). Низкое давление поддерживается с помощью механического форвакуумного (до 0,3 торр) и масляного диффузионного высоковакуумного насоса.

И н т е р ф е й с. Основная функция интерфейса, соединяющего газовый хроматограф и МСД, состоит в создании градиента давления от почти атмосферного на выходе из капиллярной колонки до высокого вакуума в МСД. Интерфейс HP-5890/5971 относится к группе прямого ввода, обеспечивающей перенос всего объема пробы из колонки в камеру ионного источника. В интерфейсе поддерживается температура 280°С независимо от температуры колонки.

И о н н ы й и с т о ч н и к. В ионном источнике образуется поток электронов, вызывающих ионизацию нейтральных молекул пробы. Энергия электронов 70 эв достаточна для ионизации большинства органических молекул: образования возбужденного молекулярного иона и его дальнейшей фрагментации. Возбужденный молекулярный ион $M^{+\cdot}$ распадается мономолекулярно с отщеплением нейтральных частиц (радикалов или молекул) и образованием различных осколочных ионов. Наиболее вероятный путь распада приводит к появлению наиболее интенсивной полосы в масс-спектре, отвечающей "базовому" иону. Среди остальных фрагментарных ионов аналитическое значение имеют "характеристические", свойственные данному соединению или группе соединений. Молекулярный ион

устойчивых к электронному удару молекул (например, с ароматической структурой) представлен в масс-спектре интенсивной полосой, в то время как в спектре нестабильных структур, склонных к фрагментации, он может быть малоинтенсивным или отсутствовать.

Процессы, протекающие в ионном источнике:

— образование молекулярного иона

$M + e \rightarrow (M^{+\cdot})^* + 2e,$

$(M^{+\cdot})^* \rightarrow M^{+\cdot} + E;$

— образование фрагментарных ионов:

— потеря радикала

$ABC^{+\cdot} \rightarrow A^+ + BC^{\cdot},$

$ABC^{+\cdot} \rightarrow AB^{\cdot} + C^+;$

— потеря нейтральной молекулы

$ABC^{+\cdot} \rightarrow AB^{+\cdot} + C;$

— перегруппировка

$ABC^{+\cdot} \rightarrow AC^+ + B^{\cdot}.$

Анализатор масс. Образовавшиеся ионы с помощью системы фокусирующих линз направляются далее в анализатор масс, или фильтр масс, где происходит их разделение по величине отношения массы к заряду (m/z) или, поскольку в основном образуются однозарядные ионы, по величине массы. В МСД это система из четырех параллельных, симметрично расположенных гиперболических стержней (квадруполь), во внутреннем пространстве которых вдоль долевой оси движется поток ионов. При этом на квадруполь наложено постоянное электрическое поле, в котором все ионы достигают выхода из анализатора. Наложением переменного высокочастотного напряжения последовательно создаются условия, благоприятные для прохождения ионов только одной массы. Последовательно фильтруя ионы по величине массы, анализатор осуществляет сканирование всех ионов в заданном интервале масс.

Детектор. Ионы определенной массы, выделенные из общего ионного потока, достигают детектора (фотоумножителя) и регистрируются. Выходные сигналы подаются на ЭВМ, где соответствующим образом обрабатываются.

16.1.5. Станция управления и обработки данных

Работа всей хромато-масс-спектральной системы обеспечивается компьютером, основные функции которого:

— настройка МСД по собственному стандарту (перфтортрибутиламину);

— установка и поддержание заданного режима работы всей системы;

— первичная обработка сигналов, принятых от МСД, и представление их в виде, удобном для исследователя (хроматограмма, масс-спектр);

— осуществление операций с первичной информацией для получения производной информации: вычитание фона, сравнение

ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ГХ/МС-АНАЛИЗА

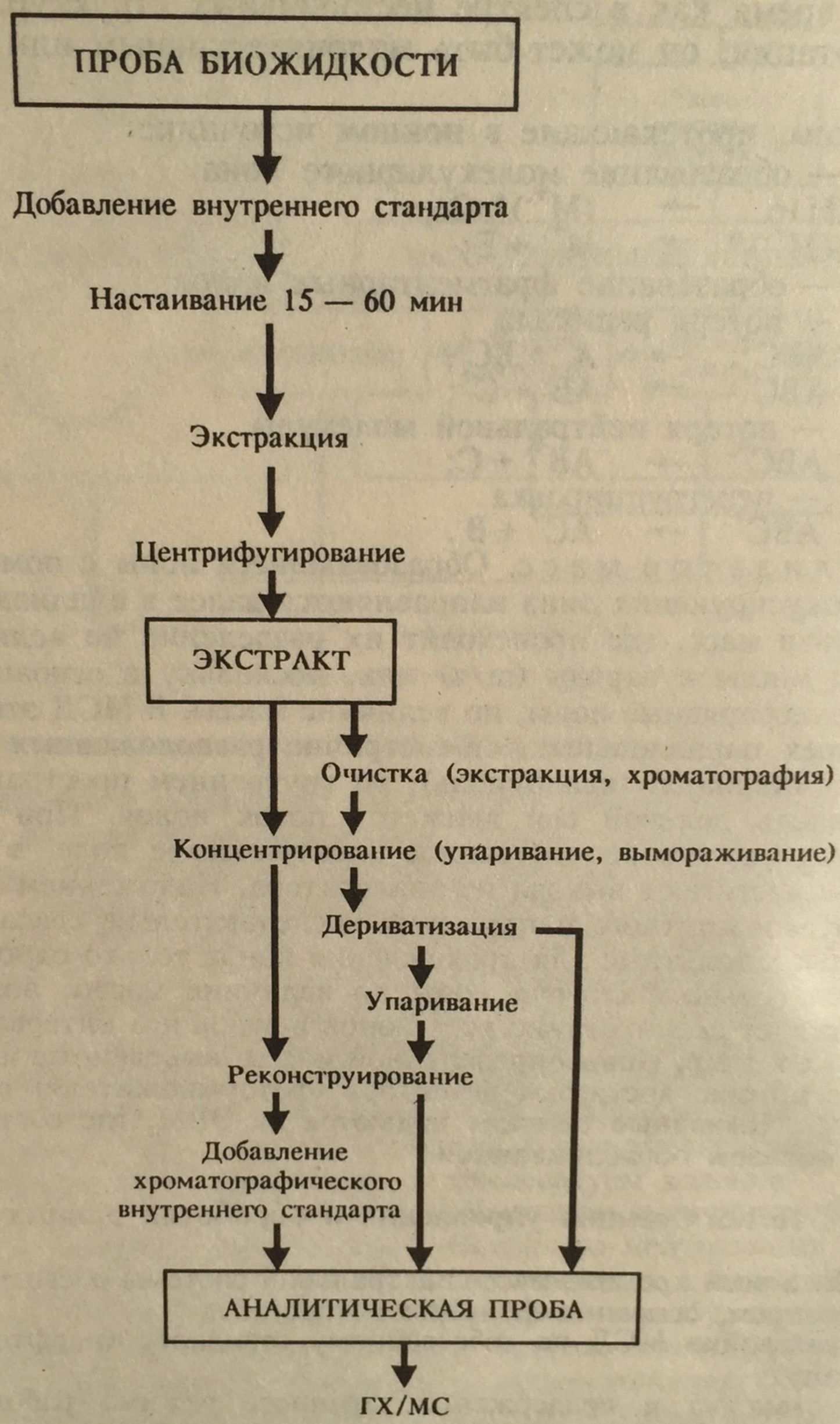


Схема 29

масс-спектров с библиотечными, интегрирование, построение калибровочного графика и др.

16.2. ПОДГОТОВКА ПРОБЫ К ГХ/МС-АНАЛИЗУ

Задачи химико-токсикологического анализа диктуют необходимость определения нанограммовых количеств компонентов на фоне эндогенных веществ биосубстратов, что выдвигает строгие требования к проведению стадии пробоподготовки:

— возможно более полное извлечение компонента и (или) его метаболитов из биосубстратов;

— минимальное извлечение эндогенных веществ, особенно белков и липидов;

— минимизация потери анализируемых компонентов;

— предупреждение загрязнений пробы примесями растворителя, материала посуды, пробок, прокладок и др.

Как следствие этих требований, необходимо прежде всего соблюдение высокого уровня техники ручных операций и особой тщательности при выполнении всех процедур.

16.2.1. Выделение (изолирование) анализируемых веществ

Извлечение анализируемого соединения (АН) после гидролиза осуществляется обычными методами: жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) и твердофазной экстракцией (ТФЭ). Последний позволяет добиться лучшего отделения эндогенных соединений, что особенно важно в отношении белков и липидов, присутствие которых в аналитической пробе не только искажает результаты анализа, но и негативно влияет на свойства хроматографической системы в целом. Другим преимуществом ТФЭ является стабилизация пробы, так как после удаления матрицы вещества не подвергаются гидролитическому или микробному воздействию. На схеме 30 представлена последовательность операций ТФЭ-изолирования кислых, основных и нейтральных лекарственных веществ для ГХ/МС-анализа.

Метод ЖЖЭ широко применяется для подготовки к ГХ/МС-анализу. Являясь в достаточной степени селективным, он позволяет провести фракционирование смеси часто в одной экстракции, а добавление последовательных стадий обратной экстракции позволяет в значительной мере избавиться от соэкстрактивных эндогенных соединений. Соэкстракция различных частиц и молекул является самым существенным недостатком ЖЖЭ как подготовки к ГХ/МС-определению и является предметом особого внимания на этой стадии. В табл. 58 приведены примеры использования ЖЖЭ для изолирования некоторых соединений.

Изолирование кислых, нейтральных и основных веществ методом твердофазной экстракции

СОРБЕНТ* с привитой группой С-18	
↓	
КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ	последовательно 2 мл метанола и 2 мл фосфатного буфера pH 6
↓	
СОРБЦИЯ	2 мл плазмы и 6 мл буфера скорость 1,5 мл/мин
↓	
ПРОМЫВКА	1 мл фосфатного буфера с 200 мкл метанола, затем 1 мл 1 М уксусной кислоты
↓	
ВЫСУШИВАНИЕ	15 мин под вакуумом
↓	
ПРОМЫВКА	1 мл гексана
↓	
ВЫСУШИВАНИЕ	1 мин под вакуумом
↓	
ЭЛЮИРОВАНИЕ КИСЛЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ	4 мл метиленхлорида скорость 1,7 мл/мин
↓	
ЭЛЮИРОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ВЕЩЕСТВ	2 мл этилацетат + 33% гидроокись аммония (98:2) скорость 0,6 мл/мин
↓	
КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ объединенных элюатов	4 мин при 40°С под слабым током азота, затем добавить 2 капли 2 М уксусной кислоты в этилацетате, упарить досуха при 40°С под слабым током азота
↓	
РЕКОНСТРУИРОВАНИЕ	в 100 мкл раствора 0,2% диэтиламина в этилацетате
↓	
ГХ/МС АНАЛИЗ	

* Типа БОНД-ЭЛЮТ. В РФ имеются в коммерческой продаже под маркой "ДИАПАК"

Схема 30

16.2.2. Концентрирование

Для анализа растворов менее 10 нг/мл даже при минимальном объеме экстрагента 500 мкл экстракт нуждается в обогащении, концентрировании. В большинстве реальных случаев объем экстрагента сравним с объемом первичной пробы, и, таким образом, концентрирование является непременной стадией пробоподготовки для большинства ЖЖЭ- и многих ТФЭ-экстрактов. Избежать концентрирования удается лишь при содержании вещества, превышающем 100 нг/мл, и объеме экстрагента не более 500 мкл (меньшие объемы неприменимы из-за летучести).

Концентрирование обычно проводится методом упаривания досуха или до 10 — 50 мкл при 40 — 60°С под слабым током азота или очищенного воздуха. Однако даже при этих условиях многие вещества, за исключением веществ с высоким молекулярным весом (стероидов), теряются.

Для предупреждения потерь летучих наркотических соединений (например, амфетаминов) их переводят в соли добавлением в экстракт нескольких капель кислоты или вводят в упариваемый раствор 10 — 20 мкл высококипящих органических соединений, например диметилформамида.

Чтобы не подвергать экстракт длительному тепловому воздействию, экстрагент должен быть по возможности легколетучим и небольшого объема.

Заключительным этапом перед ГХ/МС-анализом является реконструирование сухого экстракта с помощью подходящего органического растворителя: метанола, этанола, хлороформа, гексана и др. Хроматографический внутренний стандарт добавляется к веществу на этой стадии в составе реконструирующего раствора. Объем раствора 25 — 100 мкл позволяет сконцентрировать пробу в 40 — 10 раз при исходном объеме биожидкости 1 мл.

Реконструирование проводится непосредственно перед вводом аналитической пробы в инжектор хромато-масс-спектрометра.

16.2.3. Дериватизация

При анализе малолетучих и полярных соединений методом газовой хроматографии необходима дериватизация. При этом не только исключаются потери веществ из-за низкой летучести и сорбции, но и улучшаются характеристики анализа за счет более точного определения площадей пиков, форма которых становится более симметричной, и повышения чувствительности определения.

Функционально это процесс преобразования полярных групп (например, COOH, OH, NH_2 и NH) в неполярные без затрагивания основной структуры молекулы.

В качестве предшественника хромато-масс-спектрального анализа наиболее часто применяют следующие типы реакций:

1. Получение метиловых эфиров органических кислот по реакции с диазометаном:

$R - COOHR - COOCH_3$.

2. Получение триметилсилилпроизводных с силилирующими агентами, замещающими активный водород OH, NH_2 и NH групп:

$R - OHR - O - Si(CH_3)_3$ (R — ОТМС)

$R - NH_2 \rightarrow R - N - [Si(CH_3)_3]_2$ ($R - N(ТМС)_2$).

3. Получение трифторацилпроизводных с фторалкилангидридами кислот или фторациламидами, реагирующими с активным водородом OH, NH_2 и NH групп:

$R - OH \rightarrow R - O - CO - CF_3$ (R — ОТФА)

$R - NH_2 \rightarrow R - N(CO - CF_3)_2$ ($R - N(ТФА)_2$).

4. Получение ацетилпроизводных по реакции с уксусным ангидридом в безводном растворителе (пиридине):

$$R - OH + \begin{matrix} CH_3 - CO \\ CH_3 - CO \end{matrix} \Big\rangle O \rightarrow R - O - COCH_3.$$

5. Получение смешанных производных для веществ с различными функциональными группами: например, в молекуле 11-нор-9-карбокси-тетрагидроканнабинола метилируют COOH-группу и силилируют OH-группу; в молекуле фенолалкиламинов силилируют фенольный гидроксил и ацилируют аминогруппу.

Наиболее употребляемые агенты *силилирования:*

N,O-бис (триметилсилил)-ацетамид (БСА),

N,O-бис (триметилсилил)-трифторацетамид (БСТФА),

N-метил (N-триметилсилил)-трифторацетамид (МСТФА)

и *ацилирования:*

N-метил-бис(трифторацетамид) (МБТФА),

трифторуксусный ангидрид (ТФАА),

гептафтормасляный ангидрид (ГФМА),

пентафторпропионовый ангидрид (ПФПА).

Одна и та же полярная группа может быть преобразована с помощью различных агентов дериватизации. Так, гидроксил опиатов, экстрагированных из мочи,— морфина, кодеина и налорфина (внутренний стандарт) — может быть переведен в неполярную группу по реакциям перфторэтерификации (с ПФПА или ГФМА), трифторацетилирования (с МБТФА), силилирования (с БСТФА/1% триметилхлорсилана) или ацетилирования (с уксусным ангидридом в безводном пиридине). Выбор реакции дериватизации имеет важное значение для количественного определения (SIM) и основан на следующих основных критериях:

— хорошее разделение дериватов на хроматограмме;

— наличие интенсивных пиков в масс-спектре, обеспечивающих хорошую чувствительность;

— стабильность деривата во времени;

— отсутствие расщепления пиков дериватов на хроматограмме.

Руководствуясь этими критериями, рекомендуется применять для смеси опиатов два реагента: БСТФА с 1% триметилхлорсилана или уксусный ангидрид в пиридине. ПФПА и ГФМА образуют дериваты, обладающие "плохим" масс-спектром: вторичные и третичные ионы имеют низкую интенсивность. Трифторацетилирование приводит к расщеплению пика налорфина (моно- и ди-ТФА-налорфин) с изменяющимся во времени количественным соотношением и, кроме того, образует нестабильный дериват морфина: 3,6-ди-ТФА-морфин.

Таблица 57. **Групповые ионы смешанных дериватов фенолалкиламинов**

Фенолалкиламин	N—ТФА—ОТМС		Фенолалкиламин	N—ТФА—ОТМС	
	M^+	B^+		M^+	B^+
п-Гидроксиамфетамин	319	179	п-Гидроксинорэфедрин	417	267
Тирамин	305	179	п-Гидроксиэфедрин	421	267
Фоледрин	333	179	Октопамин	393	267

Соединения с двойной функцией могут быть дериватизованы поразному (фенольный гидроксил и аминогруппа фенолалкиламинов):

— силилированием обеих функциональных групп с образованием NTMC — OTMC или $N(TMC)_2$— OTMC-производных;

— трифторацилированием с образованием NТФА — OТФА или $N(ТФА)_2$— OТФА-производных;

— силилированием гидроксигруппы с последующим ацилированием аминогруппы и образованием NТФА — OТМС-производных.

Выбор того или иного варианта дериватизации определяется задачей ГХ/МС-анализа. Так, при групповом анализе фенолалкиламинов предпочтительным оказывается третий вариант дериватизации, поскольку он ведет к появлению общего, группового иона m/z:179 или 267 (табл. 57).

Одна и та же функциональная полярная группа реагирует в различной степени в зависимости от ее положения в молекуле: гидроксил фенольный, алкильный и аллильный проявляют разную активность по отношению к некоторым агентам дериватизации (МБТФА). Стерические затруднения могут приводить к полной остановке дериватизации, например, в N-этил- или N-бутилзамещенных вторичных аминах.

Перед ГХ/МС-анализом необходимо удалить избыток фторсодержащих ангидридов (ТФАА и др.), которые негативно влияют на хроматографическую систему. Силилирующие агенты обычно вводят в колонку в составе дериватизованной смеси, однако их избыток ухудшает рабочие характеристики МСД, загрязняя металлические поверхности.

Примеры приведены в табл. 58.

Таблица 58. Подготовка проб биожидкости к ГХ/МС-анализу некоторых наркотических и других одурманивающих соединений

Соединение	Биожидкость	Условия изолирования		Выход, %	Дериватизация
		pH	Экстрагент		
1	2	3	4	5	6
Амфетамин и метамфетамин	Моча (гидролиз.) (0,2 мл)	10% Na_2CO_3 0,5 мл	хлороформ: изопропанол (3:1), 6 мл	—	ГФМА (100 мкл), 80°С, 60 мин
Амфетамин и метамфетамин	Моча, плазма (1 мл)	10	хлорбутан (5 мл)		МБТФА (15 мкл), 70°С, 15 мин
Барбитураты	Моча (гидролиз.) (10 мл)	8 — 9	дихлорметан: изопропанол: этилацетат (1:1:3), 10 мл		Уксусный ангидрид в безводном пиридине (3:2), 100 мкл, 60°С, 30 мин
Барбитураты	Моча (0,5 мл)	5,5	гексан:этилацетат (6:4), 2 мл	75 — 84	Гидроксид триметилфениламмония
Бензодиазепины	Плазма (0,5 мл)	9	бутилацетат (0,4 мл)		
Бензодиазепины, содержащие ОН-группу	Плазма (0,5 мл)	9	бутилацетат (0,4 мл)		БСТФА (20 мкл), 85°С, 15 мин
Бензодиазепины	Моча, плазма (1 мл)	9,6	толуол:гептан: изоамиловый спирт (70:20:10), 100 мкл		
Бензодиазепины	Плазма (1 мл)	9	гексан:дихлорэтан (70:30), 5 мл		
Каннабиноиды	Плазма (1 мл)	7	гексан* (6 мл)		БСТФА+1% ТМХС (15 мкл), 75°С, 1 час
Каннабиноиды: метаболиты (11—ОН—ТГК и 9—СООН—ТГК)	Кровь, плазма, моча (1 мл)	2	гексан:этилацетат* (7:1), 4 мл		БСТФА+1% ТМХС (50 мкл), 90°С, 1 час
Кокаин и метаболит (метиловый эфир экгонина)	Моча (0,5—2 мл)	8,5 — 9	дихлорметан: изопропанол (3:1), 20 мл		

Продолжение табл. 58

(метиловый эфир экгонина) (0,5—2 мл) изопропанол (3:1), 20 мл

1	2	3	4	5	6
Кокаин и метаболит (норкокаин)	Плазма, моча (2 мл)	9,6	толуол:гептан: изоамиловый спирт (70:20:10), 200 мкл		
Кокаин и метаболит (бензоилэкгонин)	Плазма, моча (1 мл)	7,0	хлороформ:изопропанол* (9:1), 15 мл		ДМФА—ДПА (50 мкл), 30 сек на пламени
Кокаин, продукты пиролиза	Плазма, моча (1 мл)	9,6	метил-трет-бутиловый эфир:изопропанол (9:1), 1 мл		0,5%-ный сульфат палладия и борогидрид натрия по 5 мл, t° комн., 20 мин
Метадон	Моча (1 мл)	9,6	хлорбутан* (5 мл)	85	
Метаквалон	Моча (1 мл)	9,6	дихлорметан* (5 мл)		
Морфин, кодеин, моноацетилморфин	Моча (гидролиз.) (1 мл)	9,3	хлороформ:изопропанол (9:1), 5 мл		Уксусный ангидрид в безводном пиридине (1:1), 100 мкл, 60°С, 15 мин
Морфин, кодеин, моноацетилморфин	Плазма, моча (1 мл)	9,6	толуол:гептан: изоамиловый спирт (70:20:10), 1 мл		ТФАА (100 мкл), 70°С, 10 мин или БСТФА (100 мкл), 60°С, 1 час
Фенциклидин	Моча, плазма (1 мл)	9,6	гексан* (5 мл)	75 — 85	
Фенциклидин и монгидроксиметаболит	Моча, плазма (гидролиз.) (1 мл)	11,8	бутилхлорид:метанол (9:1), 2 мл		БСТФА+1% ТМХС (40 мкл), 70°С, 1 час

* Перед упариванием добавить к органическому экстракту 10 мкл ДМФА.

Список сокращений: гидролиз. — гидролизованная (моча или плазма), БСТФА — N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамид, ГФМА — гептафтормасляный ангидрид, ДМФА — диметилформамид, ДПА — ди-н-пропил-ацеталь, МБТФА — N-метил-бис (трифторацетамид), ТМХС — триметилхлорсилан, ТФАА — трифторуксусный ангидрид.

16.2.4. Фоновые соединения биожидкостей

От качества проведения всех операций пробоподготовки в значительной мере зависят результаты ГХ/МС-анализа.

Для контроля этой стадии в состав серии анализируемых проб обязательно включают холостые образцы биожидкости, не содержащие лекарственного вещества, которые подвергаются всем операциям аналогично исследуемой пробе. Холостая проба показывает собственный фон биожидкости и контролирует степень очистки от эндогенных компонентов, а также возможные загрязнения из растворителя и прочих реактивов ("реактивная ошибка"), материала пробок, прокладок, посуды и т.п. Эти эндогенные и экзогенные соединения образуют фон и в некоторых случаях дают на хроматограмме интенсивные пики, сравнимые с анализируемыми.

В табл. 59 приведены масс-спектры наиболее часто встречающихся фоновых компонентов.

Таблица 59. **Масс-спектры фоновых компонентов (массовые числа указаны в порядке возрастания интенсивности)**

Соединение	m/z
Пальмитиновая кислота	43, 74, 55, 129, 213, 256, 171
Стеариновая кислота	43, 74, 129, 284, 185, 241, 256
Олеиновая кислота	55, 69, 81,95, 111, 129, 264
Холестерин	386, 368, 353, 301, 275
Холестадиен	368, 147, 353, 260
Кофеин	194, 109, 82, 67, 55, 137
Теобромин	180, 55, 66, 109, 137
Никотин	84, 133, 42, 162, 161, 105, 77
Котинин (метаболит никотина)	98, 176, 118
Дибутилфталат	149, 86, 57, 223

16.3. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

16.3.1. Условия анализа

В зависимости от области применения условия и схема ГХ/МС-анализа изменяются.

Качественный анализ решает следующие задачи:
— идентификация неизвестного соединения;
— подтверждение после скрининга;
— обнаружение метаболитов.

Условия и схема анализа:
— ввод пробы обычно в режиме разделения потока;
— получение хроматограммы в универсальном режиме;
— регистрация масс-спектров в режиме сканирования;
— использование для идентификации библиотек программного обеспечения;
— логический анализ масс-спектров для подтверждения (установления) структуры;
— получение ионных (фрагментарных) хроматограмм для целевого поиска вещества с известным масс-спектром.

Количественный анализ осуществляется при следующих условиях:
— ввод пробы без разделения потока или в режиме "запаздывающего разделения потока" (split/splitless);
— условия хроматографирования подобраны оптимально для анализируемого соединения или группы соединений;
— регистрация масс-спектра в режиме детектирования отдельных ионов, селективного ионного мониторинга (SIM);
— выделение ионных хроматограмм ("количественного" и подтверждающих ионов);
— определение площадей пиков (интегрирование);
— построение калибровочного графика;
— расчет содержания анализируемого компонента в "неизвестной" пробе.

Для количественного определения необходимо использование внутреннего стандарта и серии калибровочных растворов.

16.3.2. Некоторые нежелательные процессы хроматографического и масс-спектрального определения

В целях использования всех возможностей хромато-масс-спектрального метода для получения стабильных и достоверных результатов высокой точности необходимо избежать нежелательных побочных процессов, которые могут идти при хроматографировании или в масс-спектрометре. Эти процессы приводят к потере вещества или его трансформации, что затрудняет или искажает как идентификацию, так и количественное измерение.

Для лекарственных и токсических веществ наиболее часто встречаются следующие:

— термическое разложение в инжекторе или в колонке: декарбоксилирование кислот; деацетилирование диацетилморфина (героина), в процессе которого катализатором являются металлы (никель); разложение 3-гидроксибензодиазепинового кольца (оксазепам, лоразепам, темазепам); разложение хлордиазепоксида и его метаболита, причем в двух последних примерах регистрация масс-спектра ведется для воспроизводимо образующихся стабильных продуктов реакции;

— адсорбция полярных соединений в инжекторе и в колонке (морфина, барбитуратов и многих других);

— потери веществ из-за недостаточной летучести или неправильно подобранных условий хроматографического анализа.

16.3.3. Внутренний стандарт

Получение точных результатов при количественном ГХ/МС-анализе зависит от многих факторов, которые трудно контролировать без применения внутреннего стандарта (ВС).

Хроматографический внутренний стандарт (ВСГХ) добавляется в аналитическую пробу непосредственно перед вводом в хроматограф и обычно входит в состав реконструирующего раствора. Концентрация ВСГХ в растворе должна быть сопоставима с концентрацией анализируемого соединения. В качестве ВСГХ могут быть использованы вещества широкого профиля, обладающие хорошими хроматографическими свойствами: достаточной летучестью, стабильностью, временем выхода, близким времени выхода анализируемого компонента, и симметричным пиком на хроматограмме. Внутренний стандарт и анализируемое вещество не должны перекрываться, в противном случае они должны иметь различный набор интенсивных линий в масс-спектрах, по которым осуществляются количественное определение и идентификация.

Внутренний стандарт, позволяющий контролировать весь процесс пробоподготовки и анализа, добавляется к аликвоте биожидкости, отобранной для гидролиза или изолирования, и подвергается всем операциям вместе с анализируемым веществом. В идеальном случае ВС должен вести себя на всех стадиях анализа подобно анализируемому соединению, отличаясь лишь по виду масс-спектра. В этом случае количественные соотношения остаются постоянными на всех этапах, что обеспечивает точные и воспроизводимые результаты. В наибольшей степени этим требованиям удовлетворяют аналоги, меченные стабильными изотопами, в частности дейтерированные соединения. Последние, как правило, и используются в ГХ/МС-анализе наркотических соединений.

При отсутствии дейтерированного аналога можно воспользоваться родственным соединением, изомером или гомологом.

Точное и строго одинаковое количество ВС добавляется ко всем анализируемым растворам: "холостым", калибровочным и неизвестным. Для расчета оптимального содержания ВС в аналитической пробе С(ВС) можно воспользоваться соотношением

$$C(АН_{миним}) : C(ВС) = C(ВС) : C(АН_{максим}),$$

где $C(АН_{миним})$ и $C(АН_{максим})$ — минимальная и максимальная концентрация анализируемого компонента в аналитической пробе, что для интервала 1 — 1000 нг/мкл соответствует примерно 40 нг/мкл.

16.3.4. Приготовление калибровочных растворов

Область концентраций лекарственных и токсических соединений в организме (в частности, биожидкостях) изменяется в широких пределах. Диапазон 1,0 нг/мл — 10 мкг/мл в значительной степени отражает реальные величины, расширяясь вместе с тем до пикограммов/мл в некоторых случаях анализа и до миллиграмма/мл при отравлении, например, сверхдозами наркотиков.

Калибровочные растворы готовят для диапазона концентраций в соответствии с задачами анализа. Как правило, диапазон охватывает два порядка, но в случае нелинейного калибровочного графика может быть разделен на два более узких, в пределах которых линейность сохраняется.

В табл. 60 дается один из вариантов приготовления калибровочных растворов для диапазона 10 нг/мл — 10 мкг/мл.

Таблица 60. **Приготовление калибровочных растворов**

№ п/п	Конц-ция эталонного р-ра $C_{этал}$ мг/мл	Приготовление* рабочего раствора метчика		Конц-ция метчика $C_{мет}$ мкг/мл	Состав** калибровочного р-ра			Конц-ция*** в аналитич. пробе $C_{гх}$ АН нг/мкл
					$C_{кал}$			
		$V_{этал}$ мл	$V_{общ}$ мл		ВС нг/мл	АН нг/мл	АН мкг/мл	
1	0,01	0,25	5	0,5	800	10		0,5
2	0,01	0,5	5	1,0	800	20		1,0
3	0,01	1,25	5	2,5	800	50		2,5
4	0,01	2,5	5	5,0	800	100		5,0
5	0,1	0,5	5	10,0	800	200		10,0
6	0,1	1,25	5	25,0	800	500		25,0
7	0,1	2,5	5	50,0	800	1000	1,0	50,0
8	1,0	0,35	5	70,0	800		1,4	70,0
9	1,0	0,5	5	100,0	800		2,0	100,0
10	1,0	1,25	5	250,0	800		5,0	250,0
11	1,0	2,5	5	500,0	800		10,0	500,0
Холостая проба			5		800		0	0

* Рабочий раствор метчика готовится на метаноле, этаноле или другом подходящем растворителе общего объема 5 (или более) мл.

** 100 мкл метчика и 100 мкл рабочего раствора ВС добавляют к "стандартной" биожидкости при общем объеме 5 мл.

*** Рассчитана для объема реконструирующего раствора 100 мкл и объема пробы биожидкости 5 мл.

Растворы готовят в следующей последовательности:

— эталонный раствор анализируемого соединения 1 мг/мл с последующим разведением до 0,1 и 0,01 мг/мл;

— основной раствор ВС 1 мг/мл;

— серия метчиков (рабочих растворов) (табл. 60);

— рабочий раствор ВС разведением основного раствора 1:25 до 40 мкг/мл;

— серия калибровочных растворов добавлением 100 мкл метчика и 100 мкл рабочего раствора ВС к "стандартной" биожидкости при общем объеме 5 мл.

После введения метчиков в биожидкость растворы перемешивают и оставляют на 15 — 60 минут для установления равновесия, после чего приступают к подготовке пробы согласно методике анализа.

Калибровочный график должен включать не менее трех (обычно 5 — 7) значений концентраций, равномерно распределенных по всему диапазону. Каждый из растворов готовится в трех повторностях, а раствор, соответствующий пределу обнаружения (ПрО),— в 11 — 15, так как стандартное отклонение для этой величины рассматривается как характеристика точности методики.

Для ГХ/МС-анализа за величину ПрО часто берется величина, превышающая уровень шумов в 3 — 4 раза.

16.3.5. Расчет калибровочного графика

Расчет калибровочного графика проводится ЭВМ в виде зависимости отношения площадей пиков ионов анализируемого вещества и внутреннего стандарта — S (АН)/S(ВС)— от отношения концентраций — С(АН)/С(ВС) или от концентрации анализируемого соединения в пробе биожидкости С(АН) или в аналитической пробе $C_{гх}$(АН).

Как правило, уравнение записывается в виде, удобном для расчета неизвестной концентрации:

$$C_x = A\,\frac{S(AH)}{S(BC)} + B\,,$$

где

А и В — угловой коэффициент и свободный член, коэффициенты линейной регрессии, определенные по калибровочным пробам;

C_x — концентрация анализируемого компонента в биожидкости или аналитической пробе;

S — площадь пика на ионной хроматограмме.

Калибровочный график должен быть охарактеризован по следующим критериям:

— интервалу линейности;

— величине ПрО;

— коэффициенту линейной регрессии (r);

— воспроизводимости: стандартному отклонению (σ) для величины ПрО (n = 11 — 15) или относительному стандартному отклонению ($\sigma / \bar{x}$), где $\bar{x}$ — среднее значение, или коэффициенту вариации $W = (\sigma / \bar{x})100\%$.

Устойчивость калибровочного уравнения должна проверяться каждый раз при анализе новой серии проб. На практике это выражается во введении в анализируемую серию помимо "холостого" раствора не менее двух контрольных из числа калибровочных. Все растворы анализируют одновременно, строго идентично, распределяя калибровочные (контрольные) растворы среди исследуемых аналитических проб. Если результаты анализа контрольных растворов указывают на сдвиг калибровочного графика, то необходимо делать перекалибровку в полном диапазоне.

В качестве критерия можно использовать 20%-ное отклонение контрольных результатов, определенных с помощью калибровочной прямой, от истинных, превышение которого ведет к необходимости повторения калибровки (иногда используется 10%-ный критерий).

Контрольные растворы анализируют в пяти повторностях ($n = 5$) и оценивают по следующим параметрам: среднее значение найденной концентрации ($\bar{x}$), стандартное отклонение (σ), абсолютное отклонение найденного среднего от фактической величины ($\Delta x = |\bar{x} - x_{ст}|$). Для оценки значимости систематической погрешности анализа контрольного результата пользуются критерием t, определяемым как

$$t_{\bar{x}, x_{ст}} = |\bar{x} - x_{ст}| \cdot \sqrt{n}/\sigma .$$

При $t < t_{p,k}$, где $t_{p,k}$ — коэффициент Стьюдента для $p = 0{,}95$ и $k = n - 1$, систематическая погрешность может быть приравнена нулю, т.е. она не превышает случайного разброса результатов для данного уровня вероятности p, и калибровочный график не имеет сдвига.

16.3.6. Влияние матрицы на количественное определение

Влияние матрицы на количественное определение извлекаемых соединений можно оценить, сравнивая параметры калибровочных графиков для растворов без матрицы (в подходящем растворителе, например в метаноле) и после извлечения из матрицы. Серия стандартных растворов в растворителе готовится в том же диапазоне концентраций, что и аналитическая проба. Изменение коэффициентов графика указывает на вклад влияния матрицы (при условии, что "реактивная ошибка" и прочие негативные последствия операций пробоподготовки сведены к минимуму). Количественная оценка влияния матрицы может быть рассчитана как отношение концентраций, определенных при анализе вещества в матрице и растворителе: $[C_{опр}(матр.)/C_{опр}(станд.)] \times 100\%$.

16.3.7. Анализ неизвестной пробы

Анализируемое соединение в неизвестной пробе подвергается в точности тем же операциям, что и при калибровке. Проба готовится в трех (или более) повторностях, начиная со стадии отбора аликвоты для гидролиза или изолирования.

Перед хроматографическим определением рекомендуется проверить "остаточную память" колонки, вводя растворитель, используемый для приготовления аналитической пробы. Затем проверка стабильности параметров хроматографической и детектирующей системы осуществляется при введении в 5 — 6 повторностях реконструирующего раствора, содержащего внутренний стандарт, и определении воспроизводимости измерения времени удерживания и площади пика внутреннего стандарта. Вслед за этим анализируется холостая проба с целью выявить наличие пиков эндогенных соединений, а также "реактивную ошибку" или другие негативные вклады операций пробоподготовки. При отсутствии холостой пробы из нативной биожидкости используют "стандартную" биожидкость, приготовленную растворением лиофилизованной мочи или плазмы или смешиванием равных объемов мочи от 15 — 30 здоровых добровольцев. При удовлетворительных результатах можно переходить к анализу неизвестных проб.

Следует иметь в виду, что, прежде чем анализировать пробу в режиме селективного ионного мониторинга (SIM), необходимо убедиться в отсутствии неразрешенных пиков, особенно метаболитов, так как плохое разрешение веществ со сходными масс-спектрами может привести к значительным ошибкам в количественном определении. Для этой цели пробу анализируют в режиме сканирования, подбирая условия для хорошего разделения близких по структуре соединений.

Концентрация анализируемого вещества в пробе рассчитывается с помощью ЭВМ или по результатам интегрирования с применением метода наименьших квадратов. Если результат выходит за область линейности калибровочного графика, то пробу разводят в нужной пропорции и повторяют хроматографирование.

Результат оценивается по следующим параметрам:

— среднее значение ($\bar{x}$);

— стандартное отклонение (σ), или относительное стандартное отклонение ($\sigma / \bar{x}$), или коэффициент вариации $W(\sigma/\bar{x}) \cdot 100\%$;

— доверительный интервал ($\bar{x} - \mu < X < \bar{x} + \mu$), где $\mu = t_{p,k} \cdot \sigma / \sqrt{n}$;

$t_{p,k}$ — коэффициент Стьюдента для доверительного уровня p (обычно 95%) и n измерений: $k = n - 1$.

В табл. 61 приведены характеристики количественного определения наркотических соединений, полученные в одной из лабораторий США (Лаборатория скрининга наркотических веществ, Иллинойс).

Таблица 61. **Некоторые характеристики количественного ГХ/МС-анализа наркотических веществ**

Соединение	Интервал линейности	ПрО	Анализ контрольных р-ров			
			$C_{факт}$	$C_{опр}$	σ	W
	нг/мл	нг/мл	нг/мл	нг/мл		%
Морфин	14,8 — 16 000	14,88	16 000	19 137	883	5,5
Амфетамин	16,0 — 16 000	12,9	16 000	15 877	414	2,6
ТНС — СООН	0,56 — 1 600	0,67	400	386	4	0,9
Фенциклидин	0,58 — 3 600	0,58	800	796	14	1,8
Кокаин (в виде бензоилэкгонина)	7,4 — 24 000	7,4	800	781	16	2

16.4. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГХ/МС-МЕТОДА ДЛЯ АНАЛИЗА НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

16.4.1. Идентификация методом ГХ/МС

Идентификацию наркотических и других одурманивающих соединений, выделенных из биожидкости или природных объектов, а также входящих в состав нелегально продающихся смесей, с использованием системы HP-5890/5971A рекомендуется проводить при следующих условиях.

Капиллярная кварцевая колонка HP-1 (см. 1.3) 12 м × 0,2 мм (толщина пленки фазы — 0,33 мкм); газ-носитель — гелий; давление на входе в колонку — 3 пси; скорость через систему очистки прокладки — 0,8 мл/мин; скорость в системе регулирующего клапана — 40 мл/мин.

Ввод пробы ручной; объем 1 мкл; режим ввода — с разделением потока 1:40.

Температура инжектора 250°С, температура колонки изменяется в соответствии с программой: начальная температура 150°С поддерживается постоянной 1 минуту, далее увеличивается со скоростью 20 град/мин до 250°С, сохраняется неизменной 5 минут, увеличивается со скоростью 5 град/мин до 300°С. Температура интерфейса 280°С.

Условия детектирования: энергия электронов ионизации — 70 эВ, режим сканирования ионов — от 50 до 500 абс. ед. массы.

Запись хроматограммы спустя 1 минуту после ввода пробы — задержка на пик растворителя, который не регистрируется детектором.

При этих условиях проанализированы многие вещества, абсолютное время удерживания которых приведено в табл. 62.

Таблица 62. **Абсолютное время удерживания некоторых наркотических и других одурманивающих соединений (условия анализа приведены в тексте)**

Соединение	t, мин	Соединение	t, мин
Амфетамин	1,21	Оксазепам	7,37
Эфедрон	1,81	Каннабидиол	7,51
Эфедрин	1,95	Кодеин	7,72
Барбитал	2,52	Диазепам	8,10
Фенциклидин	3,17	Морфин	8,14
Метамфетамин	3,74	Тетрагидроканнабинол	8,31
Амобарбитал	4,02	Ацетилкодеин	8,50
Пентобарбитал	4,18	Хлордиазепоксид	8,66
Лидокаин	4,47	6-моноацетилморфин	8,77
Кофеин	4,55	Аминазин	8,82
Гексобарбитал	4,73	Тизерцин	9,03
Тиопентал	4,76	Диацетилморфин	9,96
Фенобарбитал	5,18	Феназепам	10,81
Циклобарбитал	5,27	Нитразепам	11,61
Кокаин	6,52	Аминазин-сульфоксид	13,05
Медазепам	6,77	Клозапин	13,61
Дипразин	6,99	Гидазепам	16,59
Карбамазепин	7,18	Мажептил	23,99

На рис. 61 и 62 приведены хроматограммы экстрактов "уличного" героина и гашиша.

В образце "уличного" героина идентифицирован продукт ацетилирования кодеина — ацетилкодеин, а также продукт неполного ацетилирования морфина или гидролиза диацетилморфина — моноацетилморфин.

При анализе образца гашиша для определения каннабиноидов использован метод выделения ионной хроматограммы (фрагментограммы) характеристических ионов 231, 314 и 299. Обнаружены два вещества с временем выхода: 7,55 и 8,31 мин, которые были идентифицированы с использованием библиотечных спектров как каннабидиол и тетрагидроканнабинол соответственно.

Разделение стандартной смеси барбитуратов — барбитал, амобарбитал, пентобарбитал, гексобарбитал, фенобарбитал, циклобарбитал — и результаты исследования экспертного образца на содержание барбитуратов продемонстрированы на рис. 63. В экстракте биоматериала обнаружены фенобарбитал и кофеин.

Хроматограмма стандартной смеси бензодиазепинов приведена на рис. 64. В экстракте экспертного материала доказано присутствие медазепама, оксазепама и диазепама, которые были идентифицированы по времени удерживания и масс-спектрам.

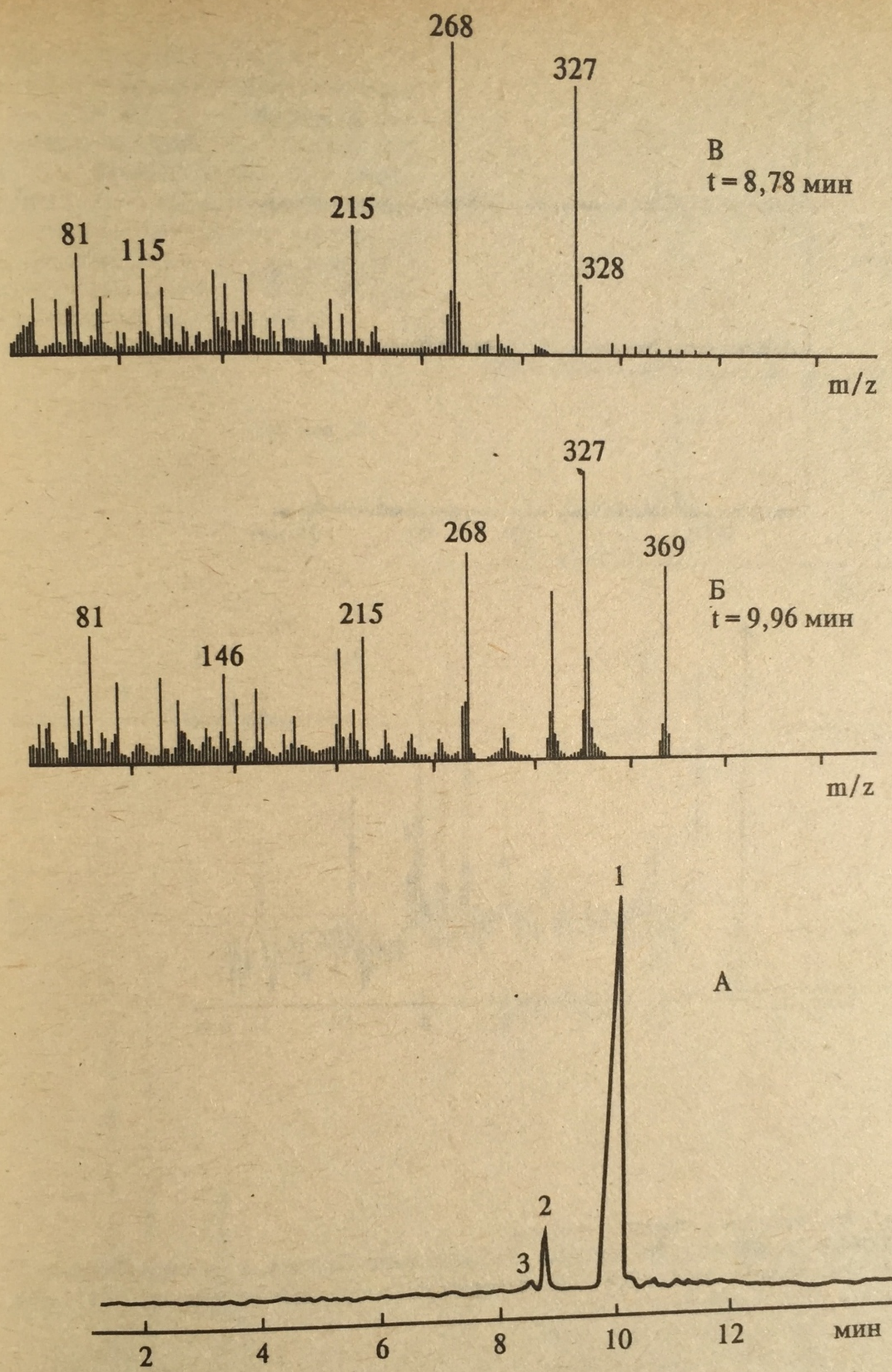


Рис. 61. Анализ "уличного" героина
А — хроматограмма экстракта образца героина, находящегося в нелегальной продаже: 1 — диацетилморфин; 2 — моноацетилморфин; 3 — ацетилкодеин. Б — масс-спектр пика 1, идентифицированного как диацетилморфин. В — масс-спектр пика 2, идентифицированного как моноацетилморфин

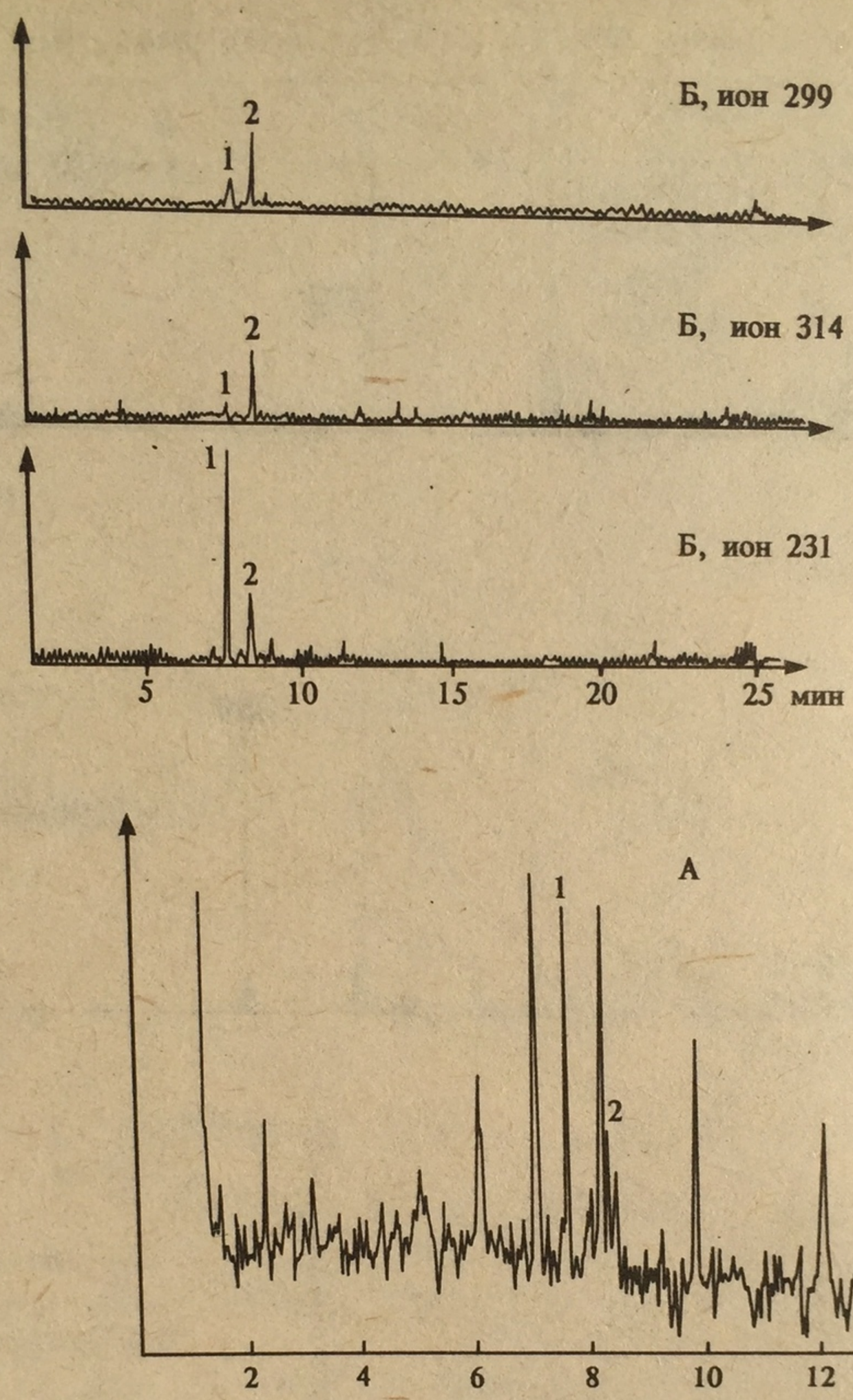
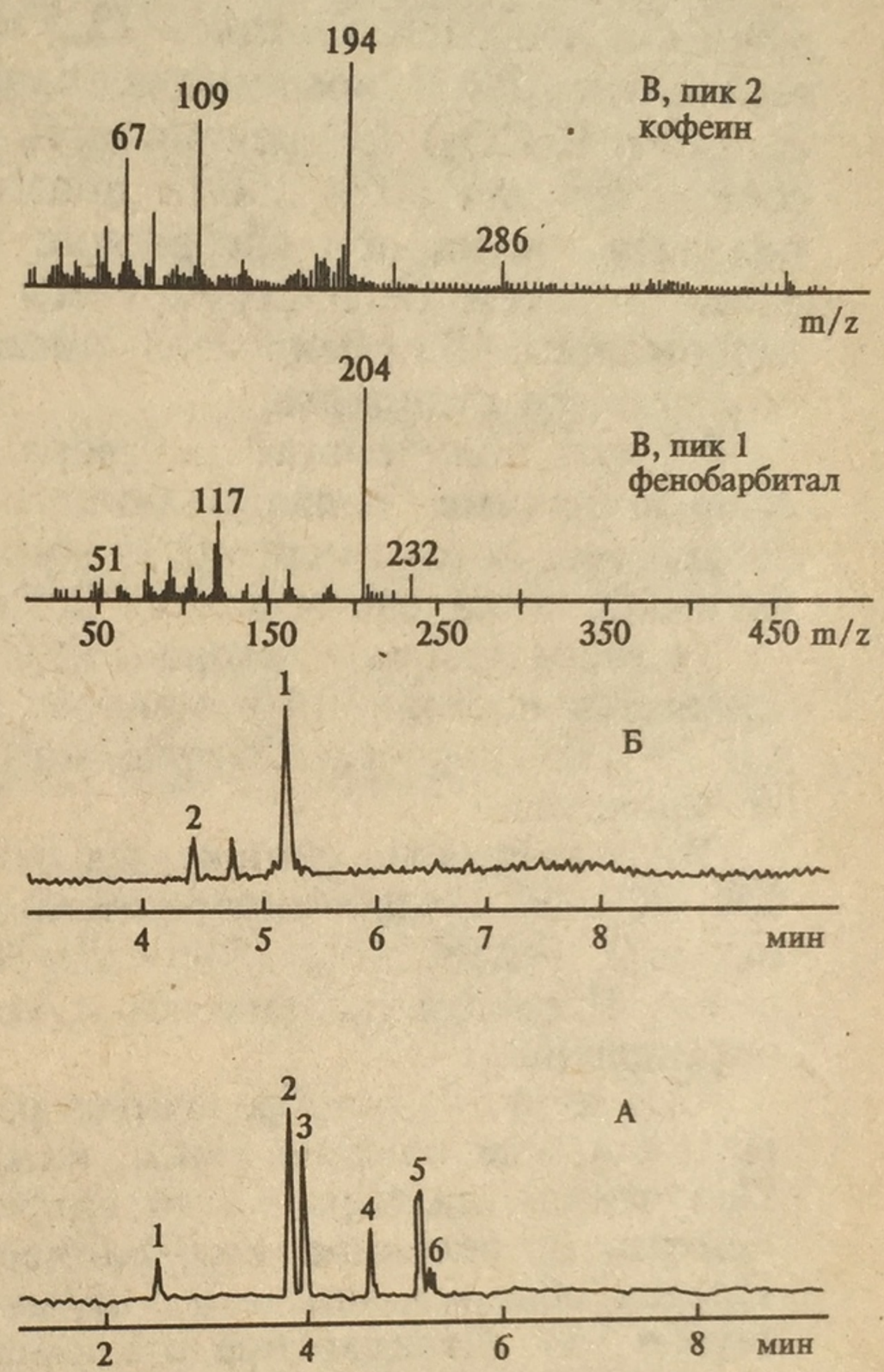


Рис. 62. Исследование образца гашиша
А — хроматограмма полного ионного тока экстракта гашиша. 1 — каннабидиол; 2 — Δ^9-тетрагидроканнабинол. Б — хроматограммы выбранных ионов: m/z 231, 314, 299

Рис 63. Анализ барбитуратов
А — хроматограмма модельной смеси: 1 — барбитал; 2 — барбамил; 3 — этаминал—натрий; 4 — гексобарбитал; 5 — фенобарбитал; 6 — циклобарбитал. Б — хроматограмма кислого экстракта экспертного материала: 1 — фенобарбитал, 2 — кофеин. В — масс-спектры пиков 1 и 2, идентифицированных как фенобарбитал (1) и кофеин (2)



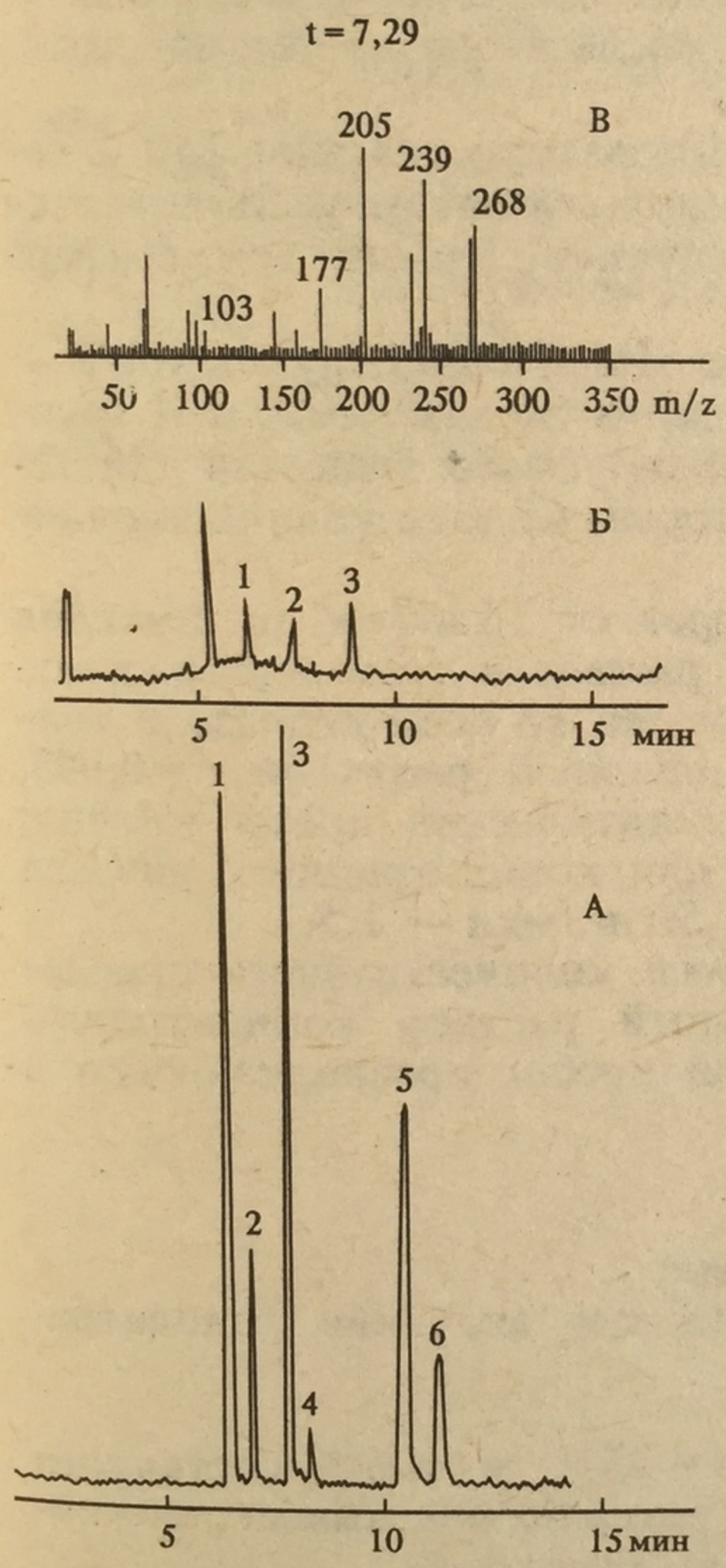


Рис. 64. Анализ бензодиазепинов
А — хроматограмма модельной смеси: 1 — медазепам; 2 — оксазепам; 3 — диазепам; 4 — хлордиазепоксид; 5 — феназепам; 6 — нитразепам. Б — хроматограмма экспертного материала: 1 — медазепам; 2 — оксазепам; 3 — диазепам. В — масс-спектр пика 2, идентифицированного как оксазепам

16.4.2. Количественный анализ диазепама

Для количественного определения диазепама в моче предложены следующие условия хромато-масс-спектрального анализа.

Подготовка пробы. Диазепам экстрагируется из 5 мл мочи смесью растворителей (2,5 мл) толуол — гептан — изоамиловый спирт (7:2:1) после подщелачивания до pH=9,6 (5 мл 50%-ного раствора K_2CO_3). Эффективность экстрагирования в этих условиях составляет для 50 — 250 нг диазепама 85 — 103%. Экстракт упаривается досуха при нагревании не выше 40°С под слабым током азота и затем реконструируется добавлением 100 мкл метанола, содержащего 40 нг/мкл медазепама в качестве хроматографического внутреннего стандарта.

0,6 мкл полученного раствора немедленно вводится в хроматограф в режиме "запаздывающего разделения потока": включение разделения потока через 0,75 минуты после ввода пробы, задержка на выход пика растворителя 2,5 мин.

Температура инжектора 250°С, температура колонки 150°С сохраняется постоянной в течение 1 минуты и затем увеличивается до 250°С со скоростью 20 град/мин, следующие 5 минут температура не меняется.

Регистрация масс-спектра в режиме SIM. Ионы I группы: m/z — 242, 207, 270 — для внутреннего стандарта (медазепама) и II группы: m/z — 256, 221, 284 — для анализируемого вещества (диазепама). Первыми указаны ионы, по которым ведется количественное определение.

Серию из 7 калибровочных растворов от 10 нг/мл до 2 мкг/мл готовили, как описано ранее, каждый раствор в трех повторностях. Полученный калибровочный график линеен во всем диапазоне концентраций: величина коэффициента линейной регрессии r = 0,998. Предел обнаружения — 0,5 нг/мкл аналитической пробы (сигнал: шум = 4:1). Стандартное отклонение для концентрации 5 нг/мкл (в аналитической пробе) — 1,8 и для 50 нг/мкл — 1,5.

Для оценки предложенной методики количественного определения диазепама в моче контрольный раствор концентрации 100 нг/мл (5 нг/мкл в аналитической пробе) проанализирован в 5 повторностях.

Определено:

среднее содержание — 104 нг/мл;

стандартное отклонение — 8,8 нг/мл;

отклонение найденного и фактического значения концентрации — 4 нг/мл;

коэффициент вариации — 8,8%.

Доверительный интервал для p = 95% и n = 5 составляет 104 ± 8,4 нг/мл. Оценка по $t_{\bar{x}, x_{ст}}$ = критерию показывает, что систематическая погрешность незначима: $t_{\bar{x}, x_{ст}} < t_{p,n}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Байерман К.* Определение следовых количеств органических веществ. М.: "Мир", 1987.

2. Руководство по газовой хроматографии/Под ред. Э. Лейбница и Х.Г. Штруппе: В 2 т. М.: "Мир", 1988.

3. *Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В.* Интерпретация масс-спектров органических соединений. Л.: "Химия", 1986.

4. *Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И.* Масс-спектрометрия органических соединений. М.: "Химия", 1986.

5. *Полякова А.А.* Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. М.: "Химия", 1983.

6. *Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С.* Хромато-масс-спектрометрия. М.: "Химия", 1984.

7. *Исаев Р.Н.* Масс-спектрометрия и ее применение: Учебное пособие. Барнаул. Алтайский госуниверситет, 1990.

8. *Заикин В.Г., Микая А.И.* Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений. М.: "Наука", 1987.

9. *Rose M.E., Johnstone R.A.W.* Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists. Cambridge, 1982.

10. *Knapp D.R.* Handbook of Analytical Derivatization Reactions. N.Y., 1979.

11. GC-MS Assays for Abused Drugs in Body Fluids/Ed. Foltz R.L., Fentiman A.F., Foltz R.B. // NIDA Research Monograph 32. August, 1980.

12. Cappillari Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Medicine and Pharmacology / Ed. Halvor Jaeger. 1990.

13. *Mulé S.J., Casella G.A.* // Analytical Toxicology. 1988. Vol. 12. P. 102.

14. *Терентьев П.Б., Станкявичюс А.П.* Масс-спектрометрический анализ биологически активных азотистых оснований. Вильнюс: "Мокслас", 1987.

ГЛАВА 17

ГХ/МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРФИНА И КОДЕИНА В ВОЛОСАХ

17.1. Пробоподготовка

Навеску (10 — 30 мг) волос промывают 5 раз метанолом (этанолом) порциями по 1 мл каждая, а затем водой. После высушивания при комнатной температуре образцы измельчают в ступке с добавлением битого стекла и 1 мл 6Н раствора хлористо-водородной кислоты до гомогенного состояния. Гомогенат нагревают при 80°С в течение 30 — 45 минут в закрытом сосуде, в охлажденную до комнатной температуры смесь добавляют 0,5 — 1 мл воды.

17.2. ЭКСТРАКЦИЯ

К 1 мл гомогената волос добавляют 25%-ный раствор аммиака до pH=10 по универсальному индикатору. Проводят экстракцию 2 мл смеси хлороформ — изопропанол (9:1) четырехкратно. Органическую фазу отбирают и сушат над безводным сульфатом натрия. Объединенный экстракт упаривают в токе воздуха до сухого остатка.

17.3. АНАЛИЗ

17.3.1. Оборудование

Исследование по обнаружению морфина, кодеина, тетрагидроканнабинола и каннабинола проводят на газовом хроматографе HP-5890 серии 2, оборудованном капиллярной колонкой HP-5 с внутренним диаметром 0,1 мм и длиной 10 м, масс-селективным детектором HP-5790. Все оборудование произведено фирмой "Хьюлетт-Паккард" (США). Газ-носитель — гелий высокой степени чистоты, линейная скорость — 1,2 мл/мин.

Условия хроматографирования: температура инжектора и интерфейса 250 и 280°С соответственно, температура колонки — градиент — 150 — 280°С, скорость программирования — 30° в минуту. Проба объемом 1 — 3 мкл вводится в колонку с помощью автосамплера HP-7673A без деления потока газа-носителя (splitless). Масс-детектор работает в режиме электронного удара при 70 эВ, за исключением напряжения на источнике ионов, которое задается на 200 — 400 В выше, чем при автоматической настройке.

17.3.2. Дериватизация анализируемых образцов

Обнаружение морфина и кодеина проводится путем перевода их в трифторацетатные и пентафторпропиатные производные по следующей методике.

К сухому остатку после экстракции добавляется 200 мкл ангидрида соответствующей кислоты и нагревается в течение 20 минут при 60° в герметически закрытом сосуде. После охлаждения до комнатной температуры удаляют избыток реагента в токе инертного газа или воздуха. К сухому остатку добавляют 50 — 250 мкл хлороформа и 1 — 3 мкл пробы вводят в хроматограф.

17.3.3. ГХ/МС-анализ опиатов

Стандартные растворы морфина и кодеина после получения их производных по указанной методике хроматографируют в указанных выше условиях и получают масс-спектры в режиме сканирования 50 — 600 а.е.м. Данные спектры сравнивают со стандартными спектрами библиотек масс-спектров WILEY, NBS и Pfleger. На рис. 65 приведены масс-спектры трифторацетатных (ТФА) и пентафторпропиатных (ПФП) производных морфина и кодеина.

Таблица 63. **ГХ/МС-характеристики производных опиатов**

Вещество	Характеристические ионы и их интенсивность, %	Время удерживания, мин
Морфин-2ТФА	69 (34), 364 (100), 477М (22)	3,5 — 4,5
Морфин-2ПФП	119 (22), 414 (100), 577М (51)	4,5 — 5,5
Кодеин-ТФА	281 (29), 282 (100), 395М (61)	4,5 — 5,5
Кодеин-ПФП	282 (73), 445М (99)	5,5 — 6,5
Каннабинол	295 (100), 310М (13)	6,9 — 7,3
ТГК	299 (100), 314М (85)	7,6 — 7,9

Примечание. М — молекулярный ион.

Заключение о присутствии или отсутствии исследуемого соединения в пробе проводится на основании наличия всех характеристических ионов в соответствующем временно́м интервале при совпадении в пределах 5% соотношения их интенсивностей. Эти расчеты проводятся автоматически после завершения каждого анализа с помощью специально разработанной программы, реализованной в макрокомандах обрабатывающей станции. Оценка количественного содержания исследуемых соединений проводится с использованием внешнего стандарта.

Чувствительность метода — 200 и 120 пикограмм в анализируемой пробе для производных морфина и кодеина и каннабиноидов соответственно.

Масс-спектры, хроматограммы трифторуксусных производных морфина и кодеина, а также результаты исследования волос человека, не принимавшего наркотиков, и волос наркомана (мужчина 34 лет, последний прием наркотика — 35 дней до взятия образца) представлены на рис. 66, 67, 68.

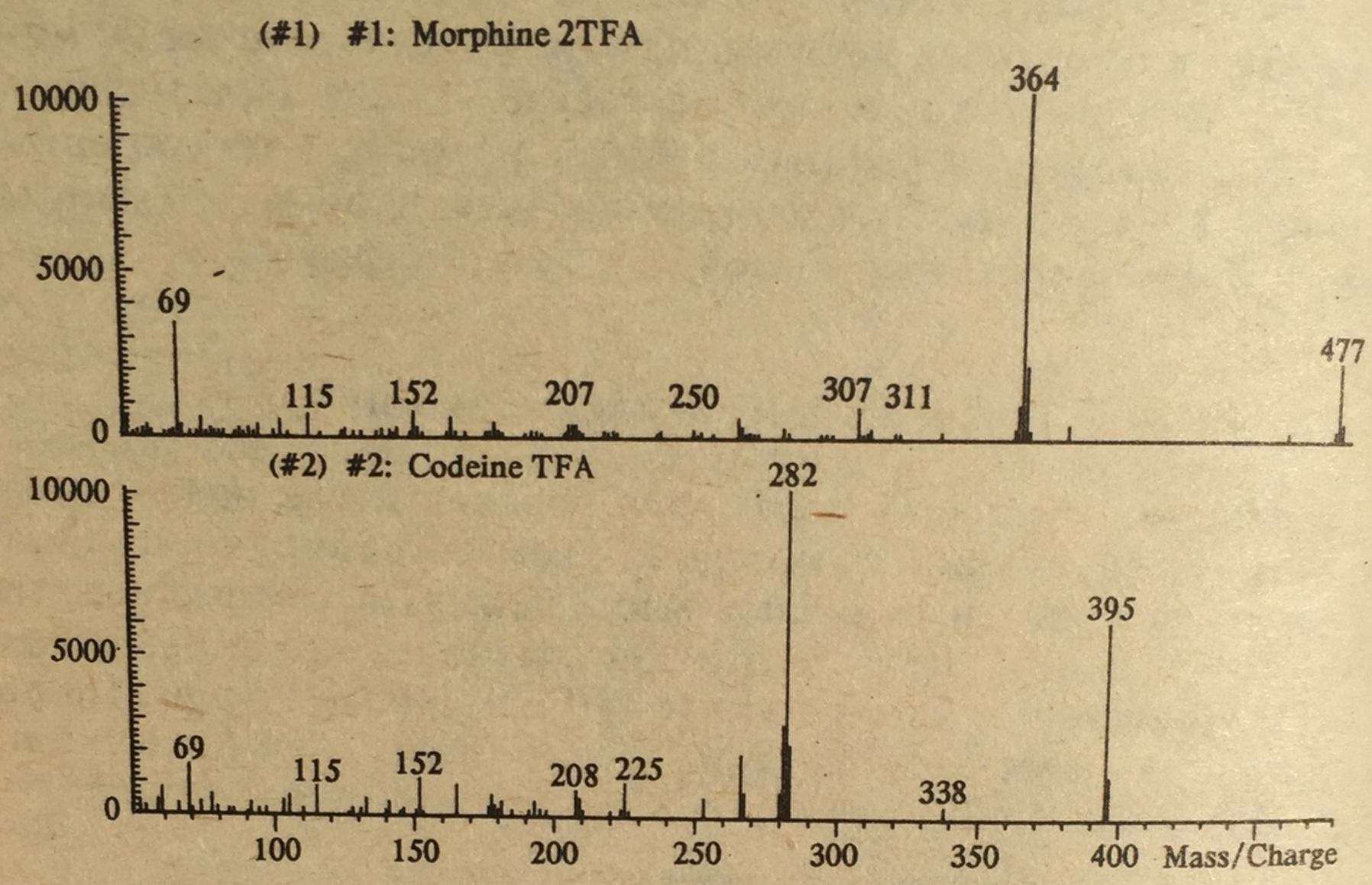


Рис. 65. Масс-спектры трифторуксусных производных морфина и кодеина

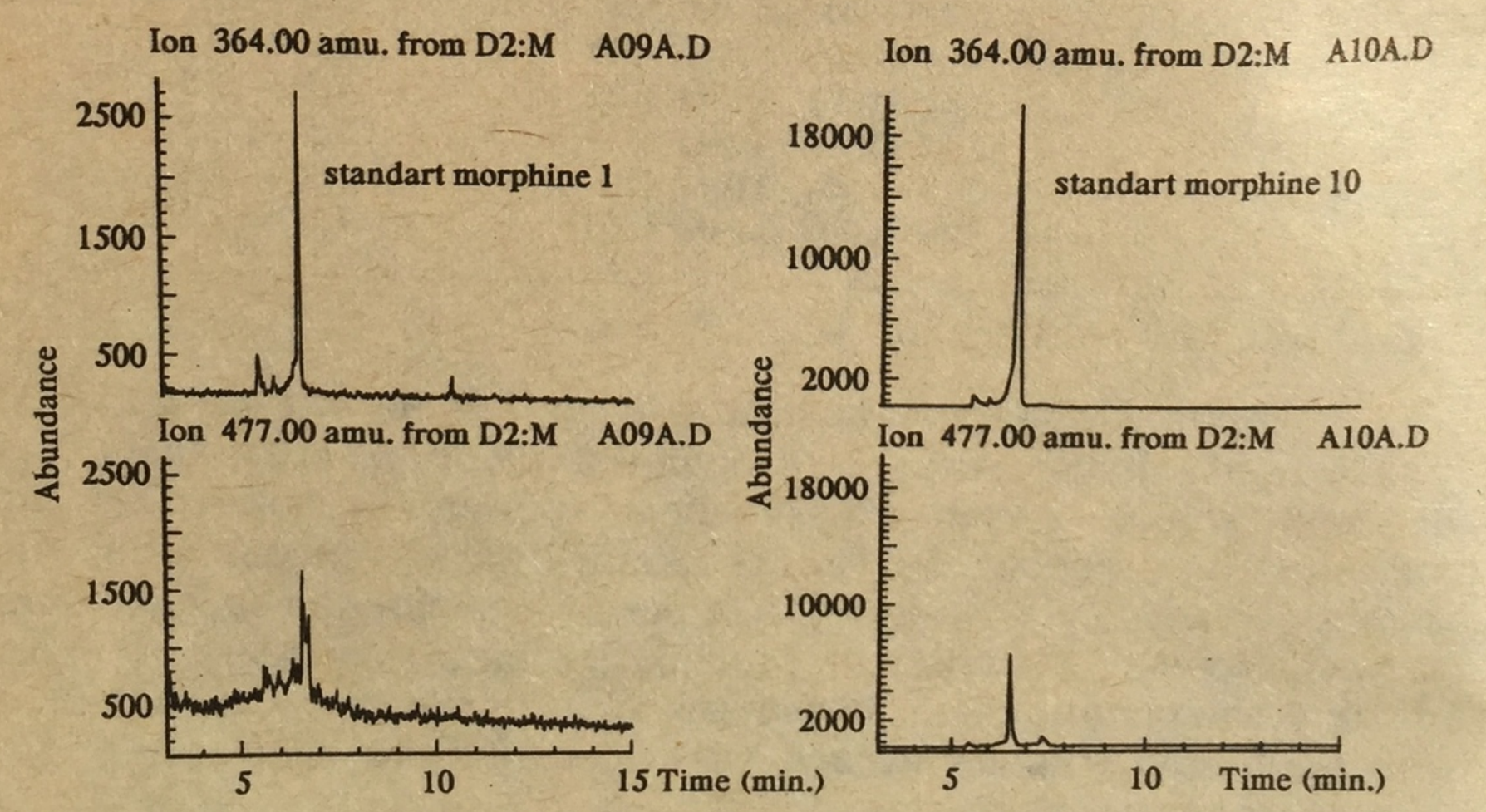


Рис. 66. Хроматограммы по ионам 364 и 477 а.е.м. трифторуксусных производных морфина в концентрациях 1 и 10 мкг/мл

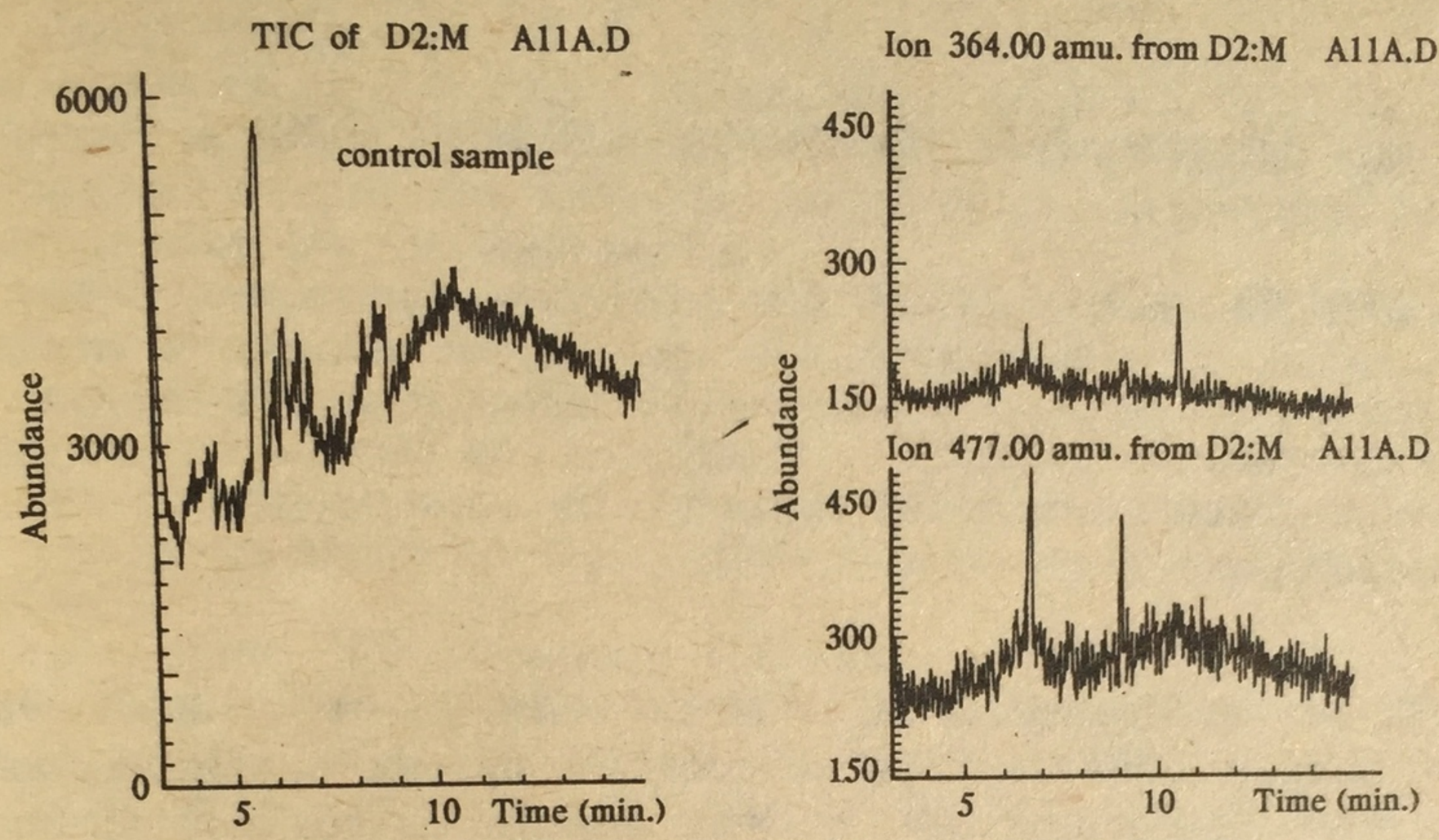


Рис. 67. Хроматограммы волос человека, не принимавшего кодеин или морфин

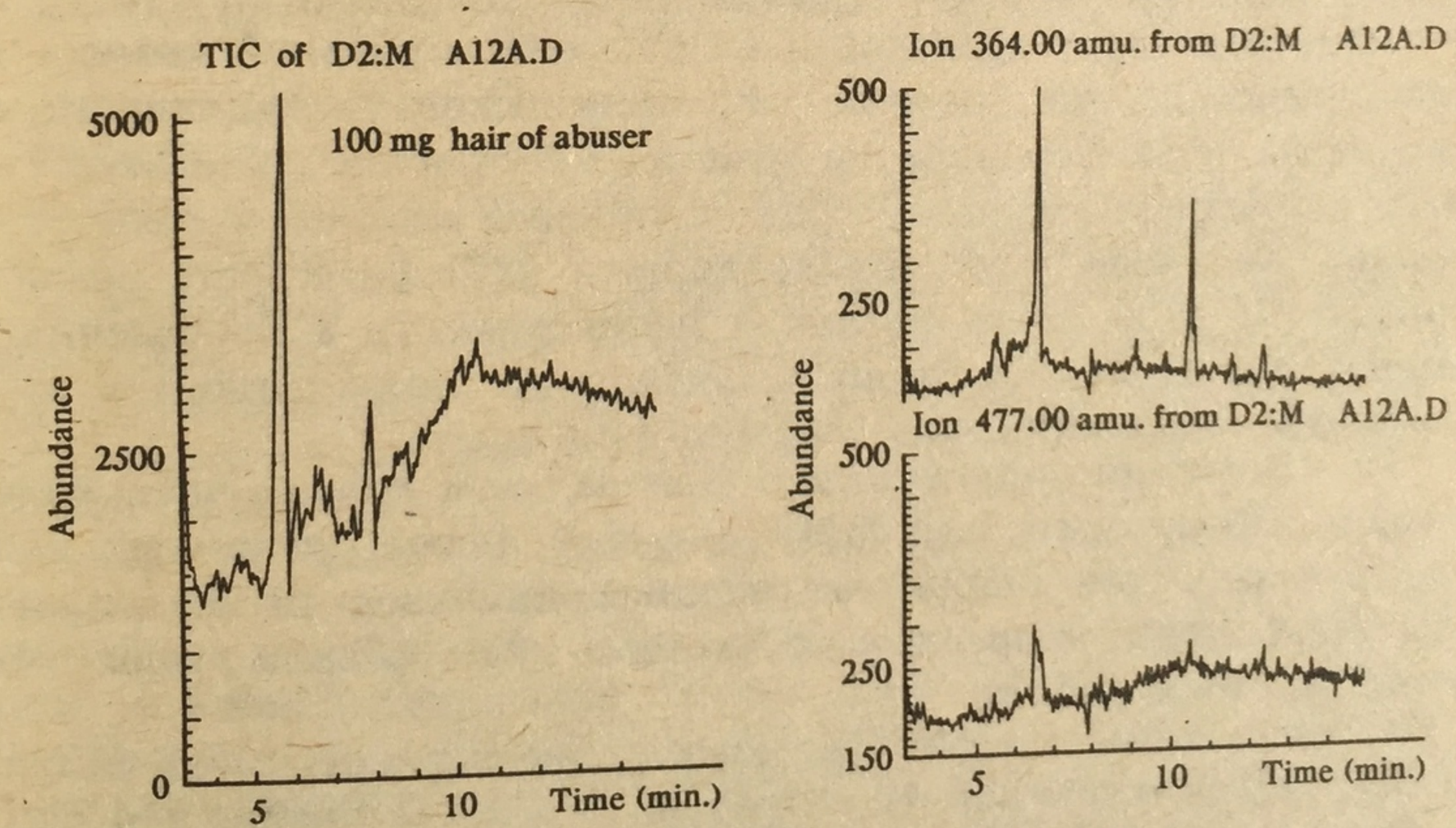


Рис. 68. Реконструированная и ионные хроматограммы экстракта из 100 мг волос наркомана

ПРИЛОЖЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

27.06.90 №10 — 14/20

Об организации работы
химико-токсикологических
лабораторий

В письме Минздрава СССР № 06 — 14/3 — 14 от 12.01.1988 г. "О полном анализе наркотических и других одурманивающих средств" дано определение полного анализа одного образца биологической жидкости, который может быть выполнен за 2 рабочих дня (14 часов), а также рекомендовано вводить должности врачей-лаборантов в штатное расписание химико-токсикологической лаборатории из расчета 1 должность на 264 анализа в год.

Однако в адрес Минздрава СССР и Центральной химико-токсикологической лаборатории 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова поступили с мест письма о несоответствии между продолжительностью одного полного анализа и количеством полных анализов в год, приходящихся на 1 должность врача-лаборанта. В этой связи возникла необходимость в проведении дополнительных исследований и обобщений накопленного в работе химико-токсикологической лаборатории опыта.

На основании полученных в Центральной химико-токсикологической лаборатории 1-го ММИ им. И.М. Сеченова данных произведен перерасчет количества полных анализов на 1 должность врача-лаборанта и предложена система учета объема выполняемой в лаборатории работы.

Исходя из 6-часового (в бюро судмедэкспертиз — 5-часового) рабочего дня и временны́х затрат на 1 полный анализ (14 часов), следует, что врач-лаборант может выполнить один полный анализ (по методикам "Химико-токсикологического анализа веществ, вызывающих одурманивание", 1989) за 2,5 рабочих дня (врач-судмедэксперт — за 3 рабочих дня). Учитывая количество рабочих дней в году (276 раб. дней, или 1656 раб. часов,— для лабораторий наркологических диспансеров; 282 раб. дня, или 1410 раб. часов,— для лабораторий бюро судмедэкспертиз) и вышеизложенное, следует

заключить, что при установлении численности должностей в штате лаборатории рекомендуется исходить из расчета 1 должность врача-лаборанта на 118 полных анализов (ПА) в год (или 1 должность врача-судмедэксперта на 101 ПА в год).

Эта условная цифра может применяться только для расчета численности должностей и не является нормативом нагрузки врача-лаборанта. Ежедневная нагрузка сотрудников лаборатории определяется объемом текущей работы.

С целью унификации системы учета работы врача-лаборанта и упрощения отчетности лаборатории о выполненной за месяц (год) работе рекомендуется использовать нижеследующие коэффициенты перерасчета на полный анализ (ПА):

а) При ненаправленном исследовании (ТСХ-скрининг):

— подготовка пробы для проведения полного анализа (3 часа) — 0,21 ПА;

— проведение ТСХ-скрининга (11 часов) — 0,79 ПА.

Примечание. При проведении предварительных и подтверждающих исследований с использованием других методов (ИФА- и РРА-диагностика, газовая и жидкостная хроматография, микрокристаллоскопия и др.) перерасчет на ПА можно производить, разделив фактически затраченное время на 14.

б) При направленном исследовании на:

— фенотиазины, бензодиазепины, барбитураты, ноксирон (по 6 часов на каждую группу веществ) — 0,43 ПА;

— опиаты (9 часов) — 0,64 ПА;

— эфедрон, эфедрин (2 часа) — 0,14 ПА;

— каннабиноиды (4 часа) — 0,28 ПА;

— спирты и другие летучие вещества (2 часа) — 0,14 ПА.

Таким образом, в штате лабораторий, на которые, согласно приказу Минздрава СССР №9 от 05.01.1989 г., возложены функции аналитической диагностики наличия алкоголя, наркотических и других одурманивающих веществ в биологических жидкостях человека, рекомендуется для выполнения указанной работы вводить должности из расчета:

1 должность врача-лаборанта на 118 полных анализов в год (или 1 должность врача-судмедэксперта на 101 ПА в год); должность заведующего лабораторией — при наличии в штате трех и более должностей врачей-лаборантов вместо одной из этих должностей; должность старшего лаборанта — соответственно должности заведующего лабораторией; должности лаборантов — соответственно должностям врачей-лаборантов; должности санитарок — 0,5 должности на каждую должность врача-лаборанта.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

10.09.90 №10 — 14/28

О материалах и оборудовании, необходимом для оснащения химико-токсикологических лабораторий

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, АДРЕСА ИЗГОТОВИТЕЛЕЙ

1. ПЛАСТИНЫ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ:

— высокоэффективные пластины на стеклянной подложке (ВЭТСХ), 20 x 20.

Адрес: 203170, Эстонская ССР, г. Хаапсалу, ул. Хольми, 14, Рыболовецкий колхоз "Ляэне-Калур", председателю правления Т.О. Суклес;

— пластины на синтетической подложке "Сорбфил", 10 x 10.

Адрес: 350020, г. Краснодар, ул. Калинина, 341, ПКБ "Пластмаш", директору Геннадию Михайловичу Сычеву.

2а. НОРМОКОМПЛЕКТ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В него входят хроматографические камеры, ванночки для импрегнирования, пульверизаторы, микрокапы и др. материалы. В стадии разработки. Можно посылать заявки и получить детальную информацию по адресу: г. Ленинград, Новолитовская, 15, ВНИКИ, мед. лаборат. техники. Руков. группы мед. обеспеч. разработок Льву Михайловичу Пыркову.

2б. Набор для тонкослойной хроматографии. Адрес: 350680, г. Краснодар, ул. Калинина, 341, ИЦ "Машиностроитель", Н.Н. Яновской. Тел. 55-84-16.

3. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО (АППАРАТУРНОГО) И КАЧЕСТВЕННОГО (ВИЗУАЛЬНОГО) ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ (МОРФИНА, КОДЕИНА, ГЕРОИНА) В БИОЖИДКОСТЯХ. Чувствительность метода — 300 нг/мл, продолжительность анализа — 1,5 часа. Один набор рассчитан на проведение анализа 40 — 45 образцов. Инструкция прилагается. Адрес: 125422, Москва, Дмитровский проезд, 4, строение 3. Фирма "Синтест", генеральному директору О.Ю. Полевой.

4. КОМПЛЕКТ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА:

— одноканальный микроплейтфотометр ИФКО-2,

— встряхиватель для иммунологических планшетов,

— набор автоматических микропипеток: 8-канальная (цена — 800 р.) и одноканальная.

Адрес: 125422, Москва, Дмитровский проезд, 4, строение 3. Фирма "Синтест", генеральному директору О.Ю. Полевой.

Этот комплект оборудования может быть использован и для определения каннабиноидов, эфедрина, эфедрона, барбитуратов. Наборы реактивов для этих групп веществ будут предложены потребителю в 1991 г.

5. НАБОРЫ "НАРКОСКРИН-1" ДЛЯ РАДИОРЕЦЕПТОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ

Диапазон определяемых концентраций — β — 60 нмоль/л, продолжительность анализа — 3 часа. Один набор рассчитан на проведение 98 определений. Адрес: 113149, Москва, Симферопольский бульвар, 8, НЦ молекулярной диагностики, зам. директора А.Г. Ишкову.

6. ЖИДКОСТНЫЙ СЦИНТИЛЯЦИОННЫЙ β-СЧЕТЧИК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РАДИОРЕЦЕПТОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ

Предназначен для регистрации радионуклидов в широком энергетическом диапазоне — от трития до фосфора. Переносной, выполнен в виде чемодана "дипломат". Адрес: 123371, Москва, Волоколамское шоссе, 91, ВНИИ биологического приборостроения, зам. директора В.В. Буянову. Можно использовать счетчик В-2, имеющийся в оснащении местных санэпидемстанций (СЭС).

7. ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ "Милихром-4" с дополнительным комплектом хроматографических колонок КАХ-2-80-4, КАХ-2-80-5, КАХ-2-80-6 по 3 шт. каждого наименования. Для определения барбитуратов, опиатов, бензодиазепинов в моче.

Адрес: 302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 40, ПО "Научприбор", генеральному директору О.Е. Ковыневу (зам. директора В.А. Плетюхину).

8. ОДИН-ДВА ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ НИЖЕ ГАЗОВЫХ ХРОМАТОГРАФОВ: "Кристалл-2000". Заявки принимают на 1991 — 1992 гг. Адрес: 424000, г. Йошкар-Ола, ул. Строителей, 94, Опытно-конструкторское бюро приборов контроля и автоматики, директору Евгению Михайловичу Блинову, зам. директора Р.С. Азизову.

"Цвет-500", мод. 530, "Цвет-500М"; "Цвет-500М", мод. 560; ХМП-4 (переносной); ХПУ-2 (промышленный). Адрес: 606000, Горьковская обл., г. Дзержинск, Дзержинское опытно-конструкторское бюро автоматики, директору Михаилу Александровичу Тюреву, гл. инженеру Юрию Семеновичу Савинову, телефон для справок 7-54-69.

ГХ-3700 с потенциометром и интегратором "ИНТЕРХРОМА-1".

Адрес: 109429, Москва, Э-424, ул. Верхние Поля, 24, Московский опытный завод "Хроматограф", начальнику отдела сбыта Дубовикову Анатолию Викторовичу. Справки по тел. 355-01-38, 355-00-01.

9. СПЕКТРОФОТОМЕТР "СФ-46".

Адрес: 194044, г. Ленинград, ул. Чугунная, 20, Ленинградское оптико-механическое объединение (ЛОМО), генеральному директору Дмитрию Васильевичу Сергееву.

С заявками на приобретение перечисленных приборов можно обратиться также в Управление "Роскомплект" Госснаба РСФСР. Адрес: 101527, Москва, А-47, 2-я Тверская-Ямская, 16, начальнику отдела Управления "Роскомплект" В.П. Боровой.

10. ШЕЙКЕР ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЙ ШЭ-3х4-750Т с системой термостатирования для мягкого перемешивания жидких сред в колбах емк. 100, 250, 750 мл и коллекторов с пробирками.

Адрес: 117218, Москва, ул. Кржижановского, 23, корп. 5, НПО ТИПКО. Тел. 124-62-79, 125-19-14.

11. УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЙ ОБЛУЧАТЕЛЬ УФО-254.

Адрес: 195197, Ленинград, Кондратьевский пр., 46, Учебно-производственные мастерские физ/мехтехникума им. С.А. Зверева, Георгию Сергеевичу Филатову.

12. ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ, которое можно приобрести через местные производственно-торговые объединения "Медтехника" и территориальные управления материально-технического снабжения ГОССНАБА:

— центрифуга лабораторная медицинская ОС-6М;
— шкаф вытяжной деревянный остекленный;
— шкаф сушильный вакуумный ШСВ-45К;
— термостат электрический суховоздушный ТС-80М2;
— аквадистиллятор ДЭ-4-2, производительность — 4 л/час;
— баня водяная лабораторная электрическая;
— дозатор лабораторный автоматический поршневой медицинский А-2;
— весы технические аптечные до 1 кг;
— весы технические аптечные ВСМ-1;
—"— ВСМ-2;
—"— ВСМ-10;
—"— ВСМ-20;
— весы торсионные ВТ-500.

13. КОМПЛЕКТНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ можно заказать по адресу: 295400, г.Мукачево Закарпатской обл., ул. Пионеров, 78, завод комплектных лабораторий.

Завод выпускает комплексы лабораторные целевого назначения, включающие аппаратуру для ТСХ, аквадистиллятор, весы лабораторные различных типов, калориметры КФК-2, спектрофотометр СФ-46, термостаты, роторы, стерилизаторы, шейкеры, центрифуги, электрошкафы, электропечи, микрокалькулятор "Электроника М-45", комплект пипеток лабораторных ПЛ-01, дозаторы, бани водяные и электрические и др., а также комплект лабораторного установочного оборудования, включающий мойки, стойки для приборов и реактивов, стойки приборные, стойки универсальные, столы пристенные химические, столы пристенные физические, стойки весовые, стол островной химический, стулья рабочие С-6, шкафы вытяжные химические.

14. ЛАБОРАТОРНОЕ СТЕКЛО. Приобретать через магазин №1 "Лабораторное стекло" (адрес: 127018, Москва, ул. Советской Армии, 17. Тел. 289-65-88) или территориальные филиалы.

Изделие	Ориентировочное количество
1	2
Бюкс 25 x 35	20
Бюкс 30 x 45	20
Бюкс 40 x 60	20
Водоструйный насос	10
Воронки делительные	50
Воронки стеклянные, 35 мл	20
—"— 56 мл	10
—"— 75 мл	20
—"— 100 мл	20
Керн и муфты (14, 19, 29)	по 10
Колба Бюхнера с воронкой на 25 мл	20
—"— 100 мл	20
—"— 250 мл	20
—"— 500 мл	20
Колба КНШ, 50 мл	50
—"— 100 мл	50
—"— 250 мл	50
Колба круглодонная КШ, 500 мл	10
Колба коническая с притертой пробкой (ø 14, 19, 29) 50 мл	50
—"— 100 мл	50
—"— 250 мл	20
—"— 500 мл	20
Колба коническая б/пробки, 100 — 500 мл	50
Колба круглодонная со шлифом ø 29, 50 мл	50
—"— 100 мл	50
—"— 250 мл	50
—"— 500 мл	50
Колба плоскодонная из термостойкого стекла, 100 мл	30
—"— 250 мл	30
—"— 500 мл	20
Колба мерная, 25 мл	10
—"— 50 мл	10
—"— 100 мл	10
—"— 250 мл	2
—"— 500 мл	2
Пипетки градуированные, 0,1	20
—"— 0,2	20
—"— 0,5	20
—"— 1,0	20
Пипетки пастеровские	20
Пробирки градуированные, 10 мл	20
—"— 20 мл	100
Пробирки колориметрические, 10 мл	

Продолжение таблицы

1	2
Пробирки химические	100
Переходник от шлифа, 29 — 14	20
—"— 29 — 19	20
Палочки стеклянные	100
Стаканы химические из термостойкого стекла, 100 мл	10
—"— 250 мл	10
—"— 500 мл	10
Стаканы фарфоровые №1	10
—"— №2	10
—"— №3	10
Ступка фарфоровая №4	5
—"— №5	5
Пестик фарфоровый №2	5
—"— №3	5
Склянка БПК, 150 мл	10
—"— 250 мл	10
Капельница Страшейна, 25 мл	10
—"— 50 мл	10
Цилиндр, 25 мл	10
—"— 50 мл	10
—"— 100 мл	10
—"— 500 мл	4
—"— 1000 мл	2
Чашки выпарительные №1	50
—"— №2	50
—"— №3	50
—"— №4	50
Чашки Петри пластмассовые	50
—"—стеклянные	50
Холодильник шариковый	5
—"—прямой	5
—"—воздушный	5

ПОРЯДОК ПРИОБРЕТЕНИЯ ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ

В адрес изготовителя направляется гарантийное письмо с указанием платежных реквизитов заказчика.

Образец гарантийного письма:

Директору (название предприятия)

_____

Просим продать по безналичному расчету (название изделия):

_____

Оплату гарантируем. Наш почтовый адрес и платежные реквизиты:

_____

(Адрес, расчетный счет в местном отделении банка)

Директор (подпись)
Главный бухгалтер (подпись)

Реактивы, необходимые для аналитических исследований (см. "Химико-токсикологический анализ наркотических и других одурманивающих веществ", 1989 г.), приобретать после подачи предварительной заявки по предъявлении доверенности и гарантийного письма.

Адрес: 101843, Москва, Кривоколенный пер., 12. Контора "Союзхимфармторг". Тел. 221-56-93, 294-96-43.

Импортные реактивы:

101887, Москва, Кривоколенный пер., 12, В/О "Союзреактив", Отдел импорта-экспорта (тел. 925-72-29).

Отечественные реактивы:

Московская контора химреактивов (адрес тот же) — тел. 928-61-73.

За справками и с заявками обращаться также в республиканские, краевые, областные конторы химреактивов и территориальные управления материально-технического снабжения ГОССНАБа.

Рутинные реактивы и органические растворители можно приобрести через местные аптечные управления (согласно приказу Минздрава СССР №118 от 09.11.87 г., п. 12).

ПРИЛОЖЕНИЕ

к протоколу заседания Постоянного комитета по контролю наркотиков при Министерстве здравоохранения СССР от 25 ноября 1987 г. №9

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянного комитета по контролю наркотиков при Министерстве здравоохранения СССР об отнесении к небольшим и крупным размерам количеств наркотических веществ, обнаруженных в незаконном хранении или обороте

I. Об отнесении к небольшим размерам следующих количеств наркотических веществ

1. Марихуана (высушенные цветущие верхушки и листья верхней части конопли разных сортов)	5 г
2. Гашиш, анаша (приготовленная смесь пыльцы от цветущих верхушек разных сортов конопли — таблетки, пилюли, спрессованные плитки, пасты, порошки и прочее)	1,0 г
3. Гашишное масло	0,5 г
4. Смола, пыльца, получаемая из цветущих верхушек различных сортов конопли	0,4 г
5. Тетрагидроканнабинолы, все изомеры	0,05 г
6. Опий (опий-сырец, экстракционный опий, а также опий, получаемый любым другим способом)	0,5 г (50 табл. по 0,01 г)
7. Солома маковая, кокнар (коробочки и стебли мака как таковые, или измельченные, или спрессованные)	10 г
8. Морфин (основание и соли)	0,03 г (3 амп. 1%-ного раствора)
9. Героин	0,015 г
10. Кодеин (основание и соли)	0,2 г (12 — 14 табл. по 0,015 г)
11. Промедол	0,03 г (1 амп. 1%-ного раствора)
12. Фенамин	0,05 г (5 табл. по 0,01 г)

13. Фентанил	0,0004 г (4 амп. 0,005%-ного раствора)
14. Омнопон	0,03 г (3 амп. 1%-ного раствора)
15. Ноксирон	0,5 г (2 табл. по 0,25 г)
16. Эфедрон	0,03 г
17. Кокаин (основание и соли)	0,02 г
18. Сомбревин	0,5 г (1 амп. 5%-ного раствора)
19. Первитин	0,03 г

II. Об отнесении к крупным размерам следующих количеств наркотических средств

1. Марихуана (высушенные цветущие верхушки и листья верхней части разных сортов конопли)	500 г
2. Гашиш, анаша (приготовленная смесь пыльцы от цветущих верхушек разных сортов конопли — таблетки, пилюли, спрессованные плитки, пасты, порошки и прочее)	300 г
3. Гашишное масло	50 г
4. Смола, пыльца, полученная из цветущих верхушек разных сортов конопли	100 г
5. Тетрагидроканнабинолы, все изомеры	5 г
6. Опий (опий-сырец, экстракционный опий, а также опий, полученный любым другим способом)	50 г
7. Солома маковая, кокнар (коробочки и стебли мака как таковые, или измельченные, или спрессованные)	2 кг
8. Морфин (основание и соли)	2,5 кг (250 амп. 1%-ного раствора)
9. Героин	1,10 г
10. Кодеин (основание и соли)	10 г (660 — 661 табл. по 0,015 г)
11. Промедол	3 г (300 амп. 1%-ного раствора)
12. Фенамин	3 г (300 табл. по 0,01 г)
13. Фентанил	0,002 г (20 амп. 0,005%-ного раствора)
14. Омнопон	3 г (300 амп. 1%-ного раствора)

15. Ноксирон	25 г (100 табл. по 0,25 г)
16. Эфедрон	3 г
17. Кокаин (основание и соли)	1 г
18. Сомбревин	5 г (10 амп. 5%-ного раствора)
19. Первитин (метамфетамин)	1,5 г

Таблица 64. Таблица смешиваемости растворителей

Растворитель	Ацетон	Ацетонитрил	Бензол	Бутанол-1	Вода	Диметил-	Диметил-	Дихлор-

Таблица 64. **Таблица смешиваемости растворителей**

Растворитель	Ацетон	Ацетонитрил	Бензол	Бутанол-1	Вода	Гексан	Гептан	Диметилсульфоксид	Диметилформамид	Дихлорметан
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ацетон										
Ацетонитрил						x	x			
Бензол					x					
Бутанол-1					x					
Вода			x	x		x	x			x
Гексан		x			x			x	x	
Гептан		x			x			x	x	
Диметилсульфоксид						x	x			x
Диметилформамид						x	x			x
Дихлорметан					x					
Дихлорэтан					x					
Диоксан										
Диэтиловый эфир					x			x		
Дипропиловый эфир					x			x	x	
Изооктан		x			x			x	x	
Ксилол					x			x	x	
Метанол						x	x			
Метилэтилкетон					x					
Пентан		x			x			x	x	
Пропанол-2										
Тетрагидрофуран										
Толуол					x					
Тетрахлорэтан					x					
Уксусная кислота										
Хлороформ					x					
Четыреххлористый углерод					x					
Циклогексан	x				x			x	x	
Циклопентан	x				x			x	x	
Этанол										
Этилацетат					x					

x Практически не смешиваются.

Дихлорэтан	Диоксан	Диэтиловый эфир	Дипропиловый эфир	Изооктан	Ксилол	Метанол	Метилэтилкетон	Пентан	Пропанол-2	Тетрагидрофуран	Толуол	Тетрахлорэтан	Уксусная кислота	Хлороформ	Четыреххлористый углерод	Циклогексан	Циклопентан	Этанол	Этилацетат
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
																x	x		
				x				x											
x		x	x	x	x		x	x		x	x			x	x	x	x		x
						x													
						x													
x		x	x	x	x			x								x	x		
x			x	x	x			x								x	x		
						x													
				x				x								x	x		
						x													
						x													

Таблица 65. Величины pKa и растворимость некоторых лекарственных препаратов

№ п/п	Вещество	pKa	Растворимость (1 часть вещества в мл растворителя)			
			вода	спирт 96°	эфир	хлороформ
1	2	3	4	5	6	7
	ВЕЩЕСТВА КИСЛОГО ХАРАКТЕРА					

Таблица 65. **Величины pKa и растворимость некоторых лекарственных препаратов**

№ п/п	Вещество	pKa	Растворимость (1 часть вещества в мл растворителя)			
			вода	спирт 96°	эфир	хлороформ
1	2	3	4	5	6	7
	ВЕЩЕСТВА КИСЛОГО ХАРАКТЕРА					
1.	Барбитал	7,8	160	15	40; 90	75; 257
2.	Барбитал-натрий		5	600	н/р	н/р
3.	Фенобарбитал	7,3	1000	15	40	50
4.	Фенобарбитал-натрий		3	25	н/р	н/р
5.	Бутабарбитал		250	1	10	3
6.	Барбамил	7,7	1500	27; 3	6	20
7.	Тиопентал	7,4				
8.	Барбамил-натрий		1	2	н/р	н/р
9.	Циклобарбитал		800	4	15	20
10.	Гексобарбитал		3000	45	80	4
11.	Салициловая кислота	2,96	550	4	3	55
	ВЕЩЕСТВА НЕЙТРАЛЬНОГО ХАРАКТЕРА					
12.	Фенацетин		200; 1700	20; 4	50	8; 15
13.	Ноксирон		1000	5	12	1
14.	Мепробамат		240	7	70	
15.	Карбромал		3000	18	25	2
16.	Кофеин	0,61	60	130		14,2/100 г
17.	Кофеин гидрохлорид		60	110	очень трудно	легко
18.	Кофеин цитрат		4	25		
19.	Теобромин	0,8	2000	2500	м/р	6000 (0,016/100 г)
20.	Теофиллин	0,5	120	80 (1,25/100 г)	очень трудно	очень трудно (1,2/100 г)
21.	Антипирин	0,8	1	1	50	1
22.	Амидопирин	5,0	20	2 (502/100 г)	13(10/100 г)	1 (100/100 г)
23.	Атропин	9,8	400	3	60	1
24.	Атропина сульфат		1	4	н/р	н/р
25.	Скополамин		10	слабо	слабо	слабо

1	2	3	4	5	6	7
26.	Скополамина гидробромид	4	30			
27.	Кокаин	8,4	3000	7	4	0,5
28.	Кокаина гидрохлорид		0,5	4,5	н/р	18
29.	Морфин	7,8	5000	250	н/р	1500
30.	Морфина ацетат		2,5	100	н/р	
31.	Морфина гидрохлорид		23	100	н/р	н/р
32.	Морфина сульфат		21	1000	н/р	н/р
33.	Морфина тартрат		10	1000	н/р	н/р
34.	Кодеин	7,9	0,83/100 г	62,5/100 г	8/100 г	50/100 г
35.	Кодеина сульфат		2	1000		
36.	Этилморфина гидрохлорид			2,22/100 г	0,4/100 г	30/100 г
37.	Папаверин	5,0	н/р	плохо	плохо	
38.	Папаверина гидрохлорид		40	120	н/р	10
39.	Папаверина сульфат		2	20	5000	20
40.	Промедол		р	р	н/р	р
41.	Хинидин	7,6	2000	17	70	н/р
42.	Хинидина сульфат		80	10	н/р	15
43.	Хинин	8,0	трудно	1	4,0	3,0
44.	Хинина сульфат	4,1	810	95	слабо	слабо
45.	Хинина дисульфат		80	50		625
46.	Хинина гидрохлорид		23	2	слабо	2
47.	Хинина дигидрохлорид		0,5	14	н/р	7
48.	Хинина фосфат		600	200		
49.	Стрихнин	8,6	7000	250(0,6/100 г)	5500(0,018/100 г)	6(15/100 г)
50.	Стрихнина гидрохлорид	2,3	40	85	н/р	
51.	Стрихнина нитрат		50	150	н/р	110
52.	Стрихнина сульфат		50	135	н/р	ограниченно
53.	Бруцин	7,0	1320	1,3	187	5
54.	Бруцина сульфат		75	105		170
55.	Эфедрин	9,6	36	1	р	р
56.	Эфедрина гидрохлорид		4	17	н/р	н/р

1	2	3	4	5	6	7
57.	Эфедрина сульфат		2	60		
58.	Никотин	8,0	р	р	р	р
59.	Кониин	11,0				
60.	Аминазин		0,4	3	н/р	1
61.	Промазин		1	2	н/р	2
62.	Прометазин		0,6	9	н/р	2
63.	Тиоридазин		н/р			
64.	Тиоридазин					

1	2	3	4	5	6	7
57.	Эфедрина сульфат		2	60		
58.	Никотин	8,0	р	р	р	р
59.	Кониин	11,0				
60.	Аминазин		0,4	3	н/р	1
61.	Промазин		1	2	н/р	2
62.	Прометазин		0,6	9	н/р	2
63.	Тиоридазин		н/р			р
64.	Тиоридазина гидрохлорид		9	10	н/р	1,5
65.	Левомепромазина гидрохлорид		умер.	умер.		
66.	Трифлюоперазин		2		н/р	
67.	Имизин	8,6				
68.	Имизина гидрохлорид		2	2	н/р	легко
69.	Хлорпротиксен		н/р	р	р	р
70.	Хлордиазепоксида гидрохлорид		10	40	н/р	н/р
71.	Хлордиазепоксид	4,6	хорошо			
72.	Сульфадимезин		н/р	120	2500	60
73.	Сульфадимезина натрий		2,5			
74.	Пахикарпин	11,8				
75.	Зоокумарин	5,05				
76.	Амитриптилин	$pK_в$ 9,4				
77.	Амфетамин	$pK_в$ 9,9	Кр=146	хлороф.	1,89	гептан
78.	Апоморфин	7,2(9,3)	$pK_в$ 8,92 (6,2) хлороформ=871	эфир=99	экстр. pH=9	

Таблица 66. **Терапевтические, токсические и летальные концентрации лекарственных и химических веществ в крови**

Соединение	Концентрации, мг/л		
	терапевтическая и нормальная	токсическая	летальная
1	2	3	4
Ацетаминофен (парацетамол)	10-20	400	1500
Ацетазоламид (диамокс)	10-15		
Ацетогексамид (димелор)	21-56		
Ацетон		200-300	550
Аминофиллин (теофиллин)	20-100		
Амитриптилин	50-200	400	10-20
Амфетамин	20-30		2 г/л
Барбитураты:			
короткого действия	1	7	10
среднего действия	1	10-30	30
фенобарбитал	10	40-60	80-150
барбитал	10	60-80	100
Бензин		любое измерение	0,94
Кофеин			100
Карбамазепин (тегретол)	2	8-10	
Четыреххлористый углерод		20-50	
Хлоралгидрат	10	100	250
Хлороформ		70-250	390
Хлордиазепоксид	1,0-3,0	5,5	20
Хлорпромазин (аминазин)	0,5	1-2	3-12
Хлорпротиксен	0,04-0,3		
Кодеин	25	2-20 мкг/мл	0,25-0,5
Дезипрамин (норпрамин)	0,59-1,4		10-20
Декстропропоксифен (дарвон)	50-200 мкг/л	5-10	57
Диазепам (сибазон)	0,5-2,5	5-20	более 5
Дигитоксин	1,7-2,1 мкг/л		320 мкг/л
Дигоксин	0,6-1,3 мкг/л	2-9 мкг/л	
Дифенгидрамин (бенадрил)	5	10	
Дифенилгидантоин (дилантин)	5-22	50	100
Этанол		1,5 г/л	3,5 г/л
Этхлорвинол (плацидил)	5	20	150
Этилхлорид			400
Диэтиловый эфир	0,9-1,0 г/л		1,4-1,89 г/л
Этиленгликоль		1,5 г/л	2-4 г/л
Ноксирон	0,2	10-80	30-100
Гидроморфон			0,1-0,3

Продолжение табл. 66

1	2	3	4
Имипрамин	0,05-0,16	0,7	2
Изопропанол		3,4 г/л	
ЛСД		1-4 мкг/л	
Лидокаин	2	6	
Литий	4,2-8,3	13,9	13,9-34,7
Мепиридин (петидин)	600-650 мкг/л	5	30
Мепробамат	10	100	200
Метадон	480-860 мкг/л	2	4
Метамфетамин		5	40
Метанол		200	890
Метаквалон	5	10-30	30
Метиприлон (нолудар)	10	30-60	100
Морфин	0,1		0,05-4
Никотин		10	5-52
Нортриптилин	1,2-1,6 мкг/л	5	13
Паральдегид	50	200-400	500
Пентазоцин (тальвин)	0,14-0,16	2-5	10-20
Перфеназин (этаперазин)		1	
Фенциклидин		5	1
Примидон (гексамидин)	10	50-80	100
Прокаинамид	6	10	
Прохлорперазин (метеразин)		1	
Промазин (пропазин)		1	
Пропоксифен	50-200 мкг/л	5-20	57
Пропранолол	0,025-0,2		8-12
Хинидин	3-6	10	30-50
Ацетилсалициловая кислота	20-100	150-300	500
Стрихнин		2	9-12
Теофиллин	20-100		
Тиоридазин	1-1,5	10	20-80
Димедрол	0,06-0,14 мкг/мл	1,0-10,0 мкг/мл	9,2
Оксазепам (нозепам)	0,03-2,7 мкг/мл		
Нитразепам	0,04-0,12 мкг/мл	0,2 мкг/мл	2,9-5,0 мкг/мл

Таблица 67. **Фармако-кинетические параметры лекарственных веществ**

Лекарственное вещество	Природа	pKa	$T_{1/2}$, час.	Распределение, л/кг	Связь с белком, %	Примечание
1	2	3	4	5	6	7
			β-АДРЕНОБЛОКАТОРЫ			
Алпренолол	основание	9,63	2—4	3, 3, 5	83—88	
Метопролол	»	9,68	2,5—6,5	5, 6	10—13	
Оксепронолол	»		2			
Пиндолол	»	8,8	3—4	2	57	
Практолол	»	9,5	9—12	1,6	10	
Пропранолол	»	9,45	2—6	3,6; 4,6	90—96	
			АНЕСТЕТИКИ (в/в)			
Алфаксалон	кислота		0,17	0,64	46	
Метохеситон	»	7,9; 8,3	3,5—6		73	
Пропанидид	»	4,4	0,15	0,68	40	
Тиопентал-натрий	»	7,3	3—8		75—90	
Лидокаин	основание	7,9	0,16	1,3	65	
Мепивакаин	»	7,5	0,12	1,2	75	
Прилокаин	»	7,9			50	
			АНАЛГЕТИКИ			
Аспирин	кислота	3,5	2—4,5	0,10—0,18	50—75	Салицилаты: зависимость от дозы и pH, $T_{1/2}$=2—4,5 (3 г), 16—19 (большие дозы)
Ибупрофен	»	4,4	2	0,14	99	
Индометацин	»	4,5	4—12	0,34—1,57	92—99	
Напроксен	»	5	10—17	0,09	98—99	
Оксифенбутазон	»	4,7	27—64		99	
Фенилбутазон	»	4,5	28—175	0,02—0,15	98—99	
Метадон	основание	8,6	18—97		85	
Морфин	амфолит	8,05; 9,9	10—44	2,8	35	
Лидол (меперидин)	основание	8,7	2,4—4	4,35	64	
Пентазоцин	»	9,0	2	3		
Кодеин	»	8	2			

Продолжение табл. 67

1	2	3	4	5	6	7

1	2	3	4	5	6	7
Декстропропоксифен	основание	6,3	12			
Парацетамол (ацетоминофен)	кислота		1,5—2	1,03	25	
Фенацетин	амфолит		0,7—1,20	1—2,1	30	
Аминопирин (амидопирин)	основание	5,0	2,7		15—20	
УСПОКАИВАЮЩИЕ						
Хлордиазепоксид (хлозепид)	основание	4,6	8—28			
Диазепам (сибазон)	»	3,3	20—42	0,7—2,6	98	Может действовать 9—53 час.; 42 — 96 час. акт. метабол
Лоразепам	амфолит	1,3—11,5	10—24			
Оксазепам (нозепам)	»	1,7; 11,6	10—14	1,6		
АНТИКОНВУЛЬСАНТЫ						
Карбамазепин	амид		18—55	1	72	
Хлорметиазол	основание	3,2	3,1—5	5,4	63	
Клоназепам	»		20—60	3,1		
Диазепам (сибазон)	»	3,3	20—42	0,7-2,6	98	
Этосуксемид	кислота	9,3	30—60	0,9	0	
Нитразепам	амфолит	3,2; 10,8	21—28	2,1	85	
Фенобарбитал	кислота	7,2	48—144	0,7	40—60	
Фенитоин	»	8,3	10—42	0,6	89—91	Зависит от дозы
Примидон	»		3,3—12,5	1	0	
АНТИДЕПРЕССАНТЫ						
Амитриптилин	основание	9,4	32—40		82—96	
Дезипрамин	»	9,5	12—54	22—59	73—92	
Имипрамин	»	9,5	8—16	20—40	75—95	
Нортриптилин	»		15—90	20—57	90—94	
АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫЕ						
Бетанидин	основание		7—11	7		
Клонидин (клофелин)	»	8,25	12,7		20	1 пациент орально

1	2	3	4	5	6	7
Гидраллазин (апрессин)	основание	7,1	2—7,8	0,45	87	Быстро 2—5,8, медл. ацетил
Метилдофа	амино-кислота	2,2; 9,2 10,6; 12	1,75	0,29	20	
Пропанолол	основание	9,45	2—6	3,6; 4,6	90—96	
Резерпин	»	6,1	46—168			
НЕЙРОЛЕПТИКИ						
Хлорпромазин (аминазин)	»	9,3	16	20	91—99	
Флуфеназин (фторфеназин)	»	3;9;8,05	14			
Галоперидол	»	8,7	21	17—30	92	
Перфаназин (этаперазин)	»	7,8	21			
Пимозид	»	8,6	29		97	
Прохлорперазин (метеразин)	»	8,1	23			
Тиоридазин	»	9,5	24			

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ — 3

ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ — 6

ГЛАВА 2. ТРЕБОВАНИЯ К ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 13

ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФАРМАКОКИНЕТИКА СРЕДСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 17

ГЛАВА 4. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБЫ К АНАЛИЗУ — 51

ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ—54

ГЛАВА 6. ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 63

ГЛАВА 7. ЭКСПРЕССНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ОДУРМАНИВАЮЩИХ СРЕДСТВ — 65

ГЛАВА 8. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА — 76

ГЛАВА 9. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ — 99

ГЛАВА 10. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ТСХ-СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОДУРМАНИВАНИЕ — 105

ГЛАВА 11. ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ — 123

ГЛАВА 12. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ — 148

ГЛАВА 13. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ — 160

ГЛАВА 14. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВ—171

ГЛАВА 15. ВЭЖХ-ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИНА — 183

ГЛАВА 16. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИООБЪЕКТАХ — 219

ГЛАВА 17. ГХ/МС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРФИНА И КОДЕИНА В ВОЛОСАХ — 246

ПРИЛОЖЕНИЯ — 250

ЦЕНТРАЛЬНЫЙ
КНИГООБМЕННЫЙ
ФОНД

ВЫДАНО
из обменного фонда РГБ

МКО

НАУЧНАЯ

С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская

АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ
СРЕДСТВ

Руководство по химико-
токсикологическому анализу
наркотических и других
одурманивающих средств

(Под редакцией профессора Б.Н. Изотова)

Редактор О.С. Рябухина
Оформление художника П.П. Рогачева
Художественный редактор Г.М. Чеховский
Технический редактор Л.В. Барышева
Корректор Т.М. Шпиленко
Операторы О.И. Леженко, М.Ю. Арефьева

Верстку подготовила О.М. Успенская
Текст набран на компьютере

Подписано в печать 26.11.92. Формат 60x88 1/16. Бумага книжно-журнальная.
Гарнитура Таймс. Офсетная печать. Усл. печ. листов 16,66. Усл. кр.-отт. 16,66.
Учетно-издательских листов 17,54. Тираж 3000 экз. Заказ № 191.

Издательство "Мысль". 117071. Москва, В-71, Ленинский проспект, 15.

Отпечатано в А.О. «Офсет».

рнальная.
кр.-отт. 16,66.

5.

АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

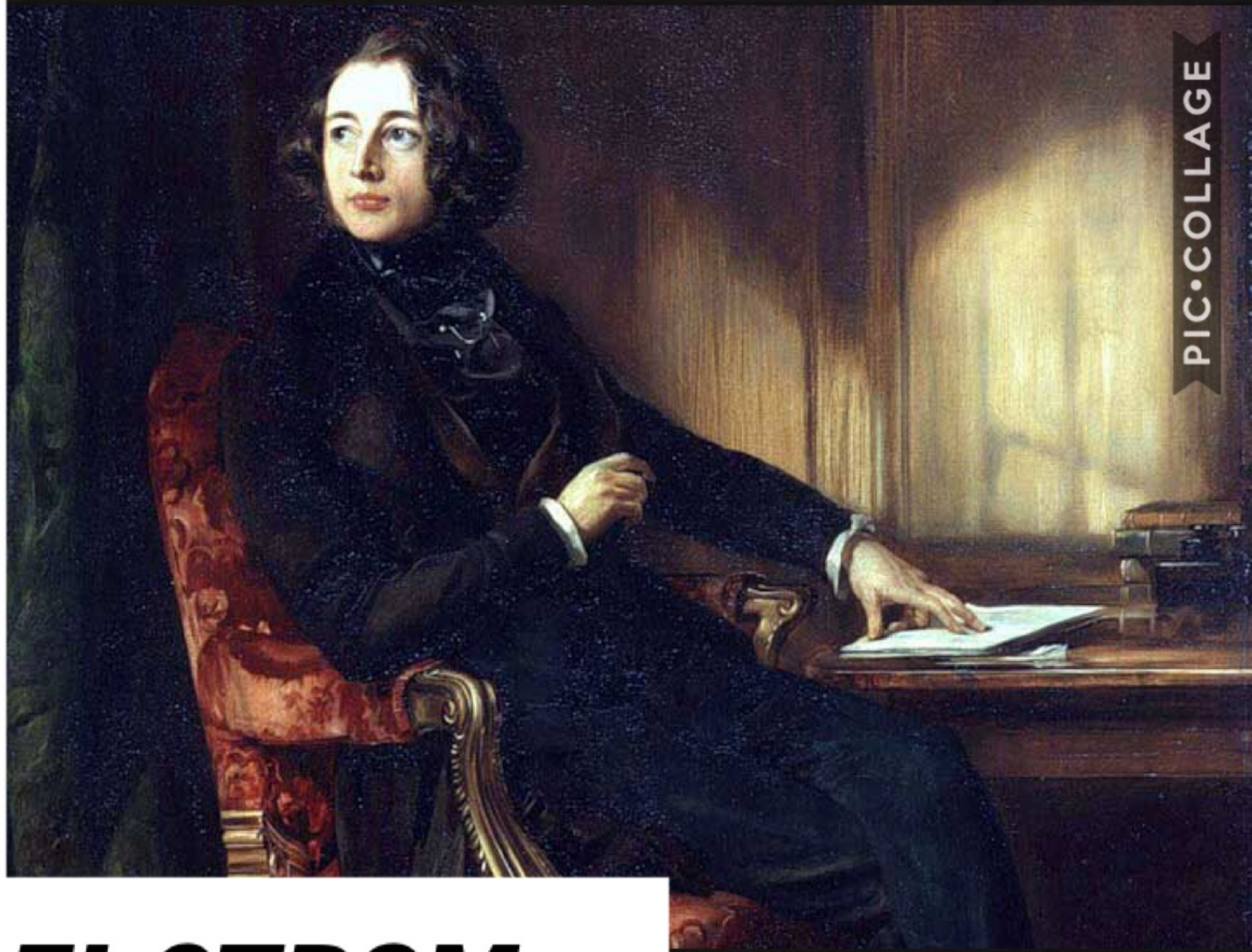
Cobra Mission Panic in Cobra City - Ending 2

Melinda ...

I want you to dance and strip for me.

1:19 / 1:19

ВСЕГДА не верьте тому что кажется, верьте ТОЛЬКО доказательствам.



Чарльз Диккенс. «Большие надежды» 1861 г.